

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ



2004

SABRINA MENDES ORTEGA LYN

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CAROTENÓIDES NATURAIS E MODIFICADOS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientação: Prof^o. José D. Fontana

CURITIBA

2004

TERMO DE APROVAÇÃO
SABRINA MENDES ORTEGA LYN

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CAROTENÓIDES NATURAIS E MODIFICADOS

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. José Domingos Fontana
Departamento de Farmácia, UFPR

Prof.
Departamento

Prof.
Departamento

Prof.
Departamento

Prof.
Departamento

Curitiba, 11 de maio de 2004

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	iv
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1 CAROTENÓIDES – ASPECTOS GERAIS	3
1.1.1 Definição e Classificação	3
1.1.2 Estrutura e Características Físico-Químicas	5
1.1.3 Biossíntese, Metabolismo e Toxicidade dos Carotenóides	7
1.1.3.1 Biossíntese dos Carotenóides	8
1.1.3.2 Metabolismo	18
1.1.4 Corantes Naturais <i>versus</i> Corantes Sintéticos	20
1.1.4.1 Toxicidade de corantes sintéticos e naturais	21
1.1.4.1.1 Toxicidade de corantes sintéticos	22
1.1.4.1.2 Toxicidade de corantes naturais	22
1.1.5 Atividade Biológica dos Carotenóides	23
1.1.5.1 Atividade Antioxidante dos Carotenóides	25
1.1.5.1.1 Radicais Livres	26
1.1.5.1.2 Atividade Antioxidante	29
1.2 CAROTENÓIDES – ASPECTOS ESPECÍFICOS	35
1.2.1 Astaxantina	35
1.2.2 β -Caroteno	37
1.2.3 Bixina	38
1.2.4 Cantaxantina	43
1.2.5 Etil Éster do Ácido Apocarotenóico	44
1.2.6 Licopeno	45
1.3 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DE CAROTENÓIDES	46
1.3.1 Acetilação	46
1.4 MODIFICAÇÕES FÍSICAS DE CAROTENÓIDES	46

1.4.1	Complexação com Ciclodextrinas	47
1.4.1.1	Estrutura e Características Físico-Químicas das Ciclodextrinas	47
1.4.1.2	Formação de Complexos de Inclusão com Ciclodextrinas	51
1.4.1.3	Metabolismo e Toxicidade das Ciclodextrinas	53
1.4.2	Complexação com Quitosana	56
1.4.2.1	Estrutura e Características Físico-Químicas do Quitosana	56
1.4.2.2	Formação de Complexos com o Quitosana	63
1.4.2.3	Metabolismo e Toxicidade do Quitosana	64
1.5	MODIFICAÇÕES ENZIMÁTICAS DE CAROTENÓIDES	66
1.5.1	Lipases	67
1.5.2	Reações de Síntese Catalisadas por Lipases	72
1.5.2.1	Acidólise	73
1.5.2.2	Alcoólise	74
1.5.2.3	Interesterificação	74
2	OBJETIVOS	78
2.1	OBJETIVO GERAL	78
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	78
3	MATERIAL E MÉTODOS	79
3.1	MATERIAL	79
3.1.1	Carotenóides de Origem Natural	79
3.1.2	Carotenóides de Origem Sintética	79
3.1.3	Ciclodextrina	79
3.1.4	Quitosana	80
3.1.5	Lipases	80
3.1.6	Outros materiais	80
3.2	MÉTODOS	80
3.2.1	Extração e Purificação dos Pigmentos Carotenóides	80
3.2.2	Modificação de Carotenóides por Meios Químicos	84
3.2.2.1	Acetilação	84
3.2.3	Modificação de Carotenóides por Meios Físicos	85
3.2.3.1	Formação de Complexos de Inclusão com β -Ciclodextrina	86
3.2.3.1.1	Formação do Complexo	86

3.2.3.1.2	Efeito da Sonicação sobre a Solubilidade do Complexo	86
3.2.3.1.3	Efeito da Adição de Etanol sobre a Solubilidade do Complexo	86
3.2.3.1.4	Efeito da Re-Adição de Carotenóide sobre a Solubilidade do Complexo	87
3.2.3.1.5	Efeito da Re-Adição de Ciclodextrina sobre a Solubilidade do Complexo	87
3.2.3.2	Complexação com Quitosana	87
3.2.3.2.1	Formação das Esférulas de Quitosana	88
3.2.4	Modificação de Carotenóides por Meios Enzimáticos	88
3.2.4.1	Esterificação dos Carotenóides pela Ação de Lipases	88
3.2.5	Avaliação da Atividade Antioxidante	89
3.2.5.1	Avaliação pelo Método de Reatividade com o radical livre DPPH*	89
3.2.5.1.1	Espectrofotometria	90
3.2.5.1.2	Cromatografia em Camada Delgada dos Produtos de Ação Redox.....	93
3.2.5.2	Determinação da estequiometria da reação DPPH* / antioxidante	93
3.2.5.3	Ensaio de Equivalência da Capacidade Antioxidante Total do Trolox C relativa ao DPPH - TEAC _{DPPH}	94
3.2.5.4	Ressonância Paramagnética Eletrônica	95
3.3	Análise Estatística	96
4	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	97
4.1	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS CAROTENÓIDES	97
4.2	MODIFICAÇÃO DE CAROTENÓIDES POR MEIOS QUÍMICOS	101
4.2.1	Acetilação	101
4.3	MODIFICAÇÃO DE CAROTENÓIDES POR MEIOS FÍSICOS	107
4.3.1	Formação de Complexos de Inclusão com β -Ciclodextrina	107
4.3.1.1	Formação do Complexo	108
4.3.1.2	Efeito da Sonicação sobre a Solubilidade do Complexo	109
4.3.1.3	Efeito da Adição de Etanol sobre a Solubilidade do Complexo	115
4.3.1.4	Efeito da Re-Adição de Carotenóide sobre a Solubilidade do Complexo	118

4.3.1.5	Efeito da Re-Adição de Ciclodextrina sobre a Solubilidade do Complexo	120
4.3.2	Complexação com Quitosana	120
4.3.2.1	Formação das Esférulas de Quitosana	120
4.4	MODIFICAÇÃO DE CAROTENÓIDES POR MEIOS ENZIMÁTICOS	127
4.4.1	Esterificação Dos Carotenóides Pela Ação De Lipases	127
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	130
4.5.1	Avaliação pelo Método de Descoloração do DPPH	131
4.5.1.1	Espectrofotometria	136
4.5.1.2	Cromatografia em Camada Delgada	156
4.5.2	Determinação da estequiometria da reação DPPH [*] / antioxidante	158
4.5.3	Ensaio de Equivalência da Capacidade Antioxidante Total do Trolox C relativa ao DPPH [*] - TEAC _{DPPH}	161
4.5.4	Ressonância Paramagnética Eletrônica	164
5	CONCLUSÕES	173
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	177
	ANEXOS	
	ANEXO I – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DE LUZ VISÍVEL DE CAROTENÓIDES, TROLOX C E DPPH [*]	188
	ANEXO II – CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA CAROTENÓIDES, TROLOX C E DPPH [*]	190
	ANEXO III – GRÁFICOS DE PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH [*] <i>versus</i> CONCENTRAÇÃO DO CAROTENÓIDE	200

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ISOMERIZAÇÃO DO TIPO <i>E</i> / <i>Z</i>	6
FIGURA 2 – ESTRUTURA BÁSICA DOS CAROTENÓIDES	8
FIGURA 3 – ESQUEMA DA BIOSÍNTESE DOS CAROTENÓIDES	9
FIGURA 4 – FORMAÇÃO DO IPP A PARTIR DO MEVALONATO	10
FIGURA 5 – FORMAÇÃO DO GERANILGERANIL PIROFOSFATO A PARTIR DO IPP	12
FIGURA 6 – BIOSÍNTESE DO FITOENO	13
FIGURA 7 – REAÇÕES DE DESSATURAÇÃO PARA A FORMAÇÃO DO LICOPENO	14
FIGURA 8 – MECANISMO PROPOSTO PARA A FORMAÇÃO DO ANEL IONENO DOS CAROTENÓIDES	15
FIGURA 9 – EXEMPLOS DE REAÇÕES DE FORMAÇÃO DE XANTOFILAS ...	16
FIGURA 10 – VIA PROPOSTA PARA A BIOSÍNTESE DA BIXINA E DA NOR- BIXINA	17

FIGURA 11 – FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES (A) E DANOS CAUSADOS AO ORGANISMO (B)	28
FIGURA 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS ISÔMEROS DA ASTAXANTINA ...	36
FIGURA 13 – ESTRUTURA QUÍMICA DO β -CAROTENO	38
FIGURA 14 – FOTOGRAFIA DO URUCUM E SUAS SEMENTES	39
FIGURA 15 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS ISÔMEROS DA BIXINA	40
FIGURA 16 – ESTRUTURA QUÍMICA DA CANTAXANTINA	44
FIGURA 17 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ETIL ÉSTER DO ÁCIDO APOCAROTENÓICO.....	44
FIGURA 18 – ESTRUTURA QUÍMICA DO LICOPENO	46
FIGURA 19 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA β -CICLODEXTRINA.....	47
FIGURA 20 – DIMENSIONAMENTO DA CAVIDADE DAS CICLODEXTRINAS ...	48
FIGURA 21 – FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINA	52
FIGURA 22 – ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITINA, QUITOSANA E CELULOSE	58

FIGURA 23 – ESQUEMA DA FORMAÇÃO DA QUITOSANA	60
FIGURA 24 – CONFORMAÇÃO ABERTA E FECHADA DAS LIPASES	70
FIGURA 25 – ETAPAS DA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO	76
FIGURA 26 – ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS CAROTENÓIDES DO URUCUM	82
FIGURA 27 – ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS CAROTENÓIDES SINTÉTICOS	84
FIGURA 28 – ESTABILIZAÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH [•]	90
FIGURA 29 – ESTRUTURA QUÍMICA DO TROLOX C	94
FIGURA 30 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DAS AMOSTRAS DE CAROTENÓIDES	98
FIGURA 31 - CROMATOGRAMAS DE CLAE DAS AMOSTRAS DE ASTAXANTINA (A) E DE BIXINA (B)	100
FIGURA 32 - ESPECTRO DE VARREDURA NA REGIÃO DO VISÍVEL DAS AMOSTRAS DE ASTAXANTINA PADRÃO E ACETILADAS	101
FIGURA 33 – DERIVADOS ACETILADOS DA ASTAXANTINA	102

FIGURA 34 – CROMATOGRAMA DE CCD DA AMOSTRA DE ASTAXANTINA ACETILADA	103
FIGURA 35 – CROMATOGRAMA DE CLAE DAS AMOSTRAS DE ASTAXANTINA MODIFICADAS POR VIA QUÍMICA	105
FIGURA 36 - CROMATOGRAMA DE CLAE DAS AMOSTRAS DE ASTAXANTINA ACETILADAS APÓS O TRATAMENTO COM NaOH	106
FIGURA 37 – COMPROVAÇÃO VISUAL DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO ENTRE CAROTENÓIDES E CICLODEXTRINAS.....	108
FIGURA 38 – EFEITO DA SONICAÇÃO DA CICLODEXTRINA NA SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM ASTAXANTINA	111
FIGURA 39 – EFEITO DA SONICAÇÃO DA CICLODEXTRINA NA SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM BIXINA	112
FIGURA 40 – EFEITO DA QUANTIDADE DE CICLOS DE SONICAÇÃO NA SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO ENTRE β -CD E CAROTENÓIDES	114
FIGURA 41 – EFEITO DA ADIÇÃO DE ETANOL NA SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS ENTRE ASTAXANTINA E β -CICLODEXTRINA E ..	116
FIGURA 42 – EFEITO DA ADIÇÃO DE ETANOL NA SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS ENTRE BIXINA E β -CICLODEXTRINA E	117

FIGURA 43 – EFEITO DA RE-ADIÇÃO DO CAROTENÓIDE AO COMPLEXO PREVIAMENTE FORMADO ENTRE CD E ASTAXANTINA (A) OU CD E BIXINA (B)	119
FIGURA 44 – FORMAÇÃO DE ESFÉRULAS DE QUITOSANA	121
FIGURA 45 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MEIOS DE SECAGEM DAS ESFÉRULAS DE QUITOSANA	122
FIGURA 46 – COMPARAÇÃO DO PESO DAS ESFÉRULAS DE QUITOSANA EM FUNÇÃO DA PORCENTAGEM DE PIROFOSFATO, DO TEMPO E DAS CONDIÇÕES DE SECAGEM	123
FIGURA 47 – COMPARAÇÃO DO TAMANHO DAS ESFÉRULAS DE QUITOSANA EM FUNÇÃO DA PORCENTAGEM DE PIROFOSFATO, DE TEMPO E DAS CONDIÇÕES DE SECAGEM.....	124
FIGURA 48 - FORMAÇÃO DE ESFÉRULAS DE QUITOSANA COMPLEXADAS COM BIXINA	126
FIGURA 49 - FORMAÇÃO DE ESFÉRULAS DE QUITOSANA COMPLEXADAS COM ASTAXANTINA	126
FIGURA 50 – ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA NA REGIÃO DO VISÍVEL DAS AMOSTRAS DE BIXINA MODIFICADAS ENZIMATICAMENTE ..	128

FIGURA 51 – ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO VISÍVEL DAS AMOSTRAS DE ASTAXANTINA MODIFICADAS ENZIMATICAMENTE	129
FIGURA 52 – FOTOGRAFIA DAS AMOSTRAS DE ASTAXANTINA E SEUS DERIVADOS QUÍMICOS E ENZIMÁTICOS APÓS REAÇÃO COM DPPH [•]	133
FIGURA 53 – FOTOGRAFIA DAS AMOSTRAS DE BIXINA E SEUS DERIVADOS QUÍMICOS E ENZIMÁTICOS APÓS REAÇÃO COM DPPH [•]	134
FIGURA 54 – FOTOGRAFIA DAS AMOSTRAS DE OUTROS CAROTENÓIDES APÓS REAÇÃO COM DPPH [•]	135
FIGURA 55 - CONSUMO DE DPPH [•] PELO TROLOX C	140
FIGURA 56 - CONSUMO DE DPPH [•] PELO LICOPENO	141
FIGURA 57 - CONSUMO DE DPPH [•] PELA ASTAXANTINA	143
FIGURA 58 – CONSUMO DE DPPH [•] PELO ÁCIDO ASCÓRBICO	145
FIGURA 59 – CONSUMO DE DPPH [•] PELA ASTAXANTINA TRATADA COM A ENZIMA NOVOZYME 435 [®]	146
FIGURA 60 – CONSUMO DE DPPH [•] PELA ASTAXANTINA TRATADA COM A ENZIMA LIPOZYME TL IM [®]	147

FIGURA 61 – CONSUMO DE DPPH [•] PELA ASTAXANTINA TRATADA COM A ENZIMA LIPASE BOVINA	148
FIGURA 62 – CONSUMO DE DPPH [•] PELA CANTAXANTINA	149
FIGURA 63 – CONSUMO DE DPPH [•] PELA BIXINA	150
FIGURA 64 – CONSUMO DO DPPH [•] PELA BIXINA TRATADA COM A ENZIMA NOVOZYME 435 [®]	151
FIGURA 65 – CONSUMO DO DPPH [•] PELA BIXINA TRATADA COM A ENZIMA LIPOZYME TL IM [®]	152
FIGURA 66 – CONSUMO DO DPPH [•] PELA BIXINA TRATADA COM A ENZIMA LIPASE BOVINA	153
FIGURA 67 – CONSUMO DO DPPH [•] PELO ETIL ÉSTER DO ÁCIDO APOCAROTENÓICO	155
FIGURA 68 – MONITORAMENTO CROMATOGRÁFICO DA REAÇÃO ENTRE ASTAXANTINA E O RADICAL LIVRE DPPH	157
FIGURA 69 – MONITORAMENTO CROMATOGRÁFICO DA REAÇÃO ENTRE BIXINA E O RADICAL LIVRE DPPH.....	158
FIGURA 70 – ESPECTRO DE RPE DO RADICAL LIVRE DPPH	165

FIGURA 71 – ESPECTROS DE RPE DAS AMOSTRAS DE CAROTENÓIDES APÓS REAÇÃO COM O RADICAL DPPH	166
FIGURA 72 – ESPECTROS DE RPE DAS AMOSTRAS DE ASTAXANTINA APÓS ACETILAÇÃO E REAÇÃO COM O RADICAL LIVRE DPPH	169
FIGURA 73 – ESPECTROS DE RPE DAS AMOSTRAS DE ASTAXANTINA APÓS MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA E REAÇÃO COM O RADICAL LIVRE DPPH	170
FIGURA 74 – ESPECTROS DE RPE DAS AMOSTRAS DE BIXINA APÓS MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA E REAÇÃO COM O RADICAL LIVRE DPPH	171

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VALORES DE COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR DOS CAROTENÓIDES	92
TABELA 2 – REDUÇÃO DA ABSORBÂNCIA DO DPPH [•] ATRAVÉS DA AÇÃO ANTIOXIDANTE DE DIVERSOS CAROTENÓIDES	138
TABELA 3 – VALORES DE PROPORCIONALIZAÇÃO ESTEQUIOMÉTRICA NA REAÇÃO ENTRE CAROTENÓIDES E DPPH [•]	159
TABELA 4 – TEAC _{DPPH} DOS CAROTENÓIDES ESTUDADOS	163

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS ^{•+}	– sal diamônico do ácido 2,2'-azonobis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico
ATP	– adenosina tri-fosfato
AGPI	– ácidos graxos poliinsaturados
CCD	– cromatografia em camada delgada
CD	– ciclodextrina
CE ₅₀	– concentração específica para diminuir em 50% o efeito testado
CGTase	– ciclodextrina glicosil transferase
CLAE	– cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	– concentração micelar crítica
CNNPA	– Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
DHA	– Ácido docohexaenóico
DINAL	– Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos
DL ₅₀	– dose letal para 50% da população em estudo
DMAPP	– dimetilalil difosfato
DMSO	– dimetilsulfóxido
DPPH [•]	– radical livre α - α -difeníl- β -picrilhidrazil
ERO	– espécie reativa de oxigênio
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
EPA	– Ácido eicopentaenóico
GPP	– geranil pirofosfato
GGPP	– geranilgeranil difosfato
HDL	– lipoproteína de densidade alta
HMG-CoA	– 3-hidroxi-3-metilglutail coenzima A

¹ H-RMN	– ressonância magnética nuclear de hidrogênios
IPP	– isopentenil pirofosfato
JECFA	– <i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
LCAB	– lipase B de <i>Candida antarctica</i>
LDL	– lipoproteína de baixa densidade
NADPH	– adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
OMS	– Organização Mundial de Saúde
PFPP	– pré-fitoeno pirofosfato
RAMEB	– <i>random methylated β-cyclodextrin</i>
REA	– relação estrutura atividade
RPE	– ressonância paramagnética de elétrons
R _f	– fator de retenção
SG-60	– sílica gel 60
SOD1	– superóxido desmutase
TEAC	– ensaio de capacidade antioxidante relativo ao Trolox C
VLDL	– lipoproteína de densidade muito baixa
WHO	– <i>World Health Organization</i>

RESUMO

Os carotenóides estão sendo cada vez mais utilizados nas indústrias de alimentos e de cosméticos devido a algumas características principais da sua estrutura que permitem que estes compostos tenham alto poder de pigmentação e sejam utilizados como potentes agentes antioxidantes. Nas últimas décadas, o processo de síntese química dos carotenóides teve uma grande evolução, bem como aumentou a preocupação da população com o uso de alimentos ou ingredientes de origem artificiais. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antioxidante de carotenóides de fontes naturais e produzidos sinteticamente e, além disso, estabelecer quais os efeitos provocados por modificações químicas (acetilação), físicas (formação de complexos de inclusão com β -ciclodextrina e com quitosana) e enzimáticas (esterificação catalisada por lipases) na propriedade bioquímica exercida pelos carotenóides estudados. Foram utilizadas técnicas de cromatografia, espectrofotometria e de ressonância paramagnética de elétrons para estudar as alterações realizadas na molécula de carotenóide e na investigação de possíveis alterações na sua capacidade antioxidante. As modificações feitas nas moléculas de astaxantina e de bixina foram capazes de alterar as suas propriedades biológicas e suas características estruturais. No caso da modificação química essa alteração se deu de forma negativa, prejudicando as atividades da astaxantina. As modificações físicas realizadas mostraram-se funcionar como estratégias para o melhor uso desses carotenóides junto às indústrias de alimentos e cosméticos e as modificações enzimáticas foram capazes de aumentar a atividade antioxidante destes compostos frente ao radical livre testado.

Palavras-chave: carotenóides, β -ciclodextrina, quitosana, lipases, atividade antioxidante, DPPH^{*}

ABSTRACT

The carotenoids are each time more been used by the food and cosmetic industries due some main characteristics of their structure that allow these compounds to have an high power of color and to be utilized as potent antioxidants agents. In the past decades, the synthesis's process of the carotenoids had a great evolution, as well as increased the preoccupation by the people with the use of substances that are not naturals. The present study has the purpose of evaluate the antioxidant activity of natural and synthetic carotenoids, and establish which effects caused by chemical modifications (acetylation), by physics modifications (formation of inclusion complexes with β -cyclodextrin and with chitosan) and by enzymatic modifications (lipase catalyzed esterification) in these biochemistry capability exerced by the carotenoids. Some techniques as chromatography, spectrophotometry and electronic paramagnetic resonance were used to study the alterations done in the carotenoid and in the investigation of possible changes on their antioxidant activity. The modifications done at the molecules of astaxanthin and bixin were capable of modify their biological proprieties and natural characteristics. In the case of chemical modification, these alterations were negative, making some kind of damage to the astaxanthin. The physics modifications done worked as a strategy to improve the use of these carotenoids by the industries of food and cosmetics and the enzymatic modifications were capable of raising the antioxidant activity of these compounds against the free radical assayed.

Key-words: carotenoids, β -cyclodextrin, chitosan, lipases, antioxidant activity, DPPH[•]

1 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo serão revisados os assuntos que estão relacionados com o trabalho desta tese: carotenóides, modificações químicas, físicas e enzimáticas e atividade antioxidante.

1.1 CAROTENÓIDES – ASPECTOS GERAIS

1.1.1 Definição e Classificação

De acordo com LATSCHA (1990) a existência dos carotenóides já é conhecida desde estudos científicos preliminares como, por exemplo, o de pigmentos lipofílicos da páprica e do açafrão – (BRACONNOT, 1817) e (ASCHROFF, 1818) respectivamente. Mais de 300 carotenóides já haviam sido identificados até 1972, e cerca de 600 até 1992 já haviam sido isolados e identificados no reino vegetal e animal. Estes compostos são de distribuição quase universal na matéria viva: desde a mais primitiva bactéria até a mais desenvolvida planta florescente, dos organismos unicelulares aos mamíferos. Atualmente, este número já foi ultrapassado por considerar-se que vários carotenóides podem ser isolados de organismos marinhos. Quimicamente os carotenóides são uma classe de pigmentos de ocorrência natural com coloração amarela, alaranjada ou avermelhada. Pigmentos são compostos químicos que absorvem luz na faixa de comprimento de onda da região visível. Eles são encontrados em organismos fotossintetizantes e não-fotossintetizantes como por exemplo: em plantas, algas, fungos, bactérias e pelo menos em uma espécie de cada forma de vida animal. São os responsáveis pela cor de muitas frutas e flores, assim como em muitos pássaros, insetos e animais marinhos. Apenas os microorganismos e plantas podem sintetizar os carotenóides. Em animais eles são adquiridos destas fontes, apesar de poderem

ser modificados durante o seu metabolismo para serem acumulados em tecidos. A produção total de carotenóides na natureza é estimada em cerca de 10^8 toneladas/ano. A maior parte desta produção está concentrada em quatro carotenóides: fucoxantina (nas algas marinhas) e luteína, violaxantina e neoxantina (em folhas verdes) (LATSCHA, 1990; PFANDER, 1992; PALACE *et al.*, 1999; DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000; HANDELMAN, 2001; CANTRELL *et al.*, 2003; CARDOUNEL *et al.*, 2003).

Os carotenóides podem ser divididos em primários ou secundários. Os carotenóides primários são aqueles compostos requeridos pelas plantas na fotossíntese (β -caroteno, violaxantina e neoxantina) enquanto os secundários estão localizados em frutos e flores (α -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina, anteraxantina, capsaxantina, capsarubina, entre outros). Os carotenóides pertencem à ampla classe dos terpenóides, a qual também inclui substâncias como óleos essenciais, fitormônios e esteróides. Na sua maior parte são hidrocarbonetos bicíclicos poliinsaturados e seus derivados oxigenados. Dependendo do grau de substituição que exibem, os carotenóides são divididos em dois grandes grupos: os carotenos e as xantofilas. Os carotenos são hidrocarbonetos puros, isto é, são constituídos inteiramente de átomos de carbono e hidrogênio. As xantofilas, em contraste, são derivadas dos carotenos correspondentes pela adição de várias funções oxigenadas. Elas podem ser consideradas como produtos de oxidação dos carotenos. Grupos hidroxila (OH) são comuns, assim como grupos aldeídos (CHO), ceto (C=O), carboxi (CO₂H), carbometoxi (CO₂Me), metoxi (OMe) e acetatos (OCOMe). Todos estes compostos devem ser derivados formalmente da estrutura cíclica C₄₀H₅₆, possuindo uma longa cadeia central de duplas ligações conjugadas por hidrogenação, desidrogenação, ciclização ou oxidação por qualquer combinação destes processos (LATSCHA, 1990; WEEDON & MOSS, 1995; CARERI *et al.*, 1999; OLIVER & PALOU, 2000; DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

1.1.2 Estrutura e Características Físico-Químicas dos Carotenóides

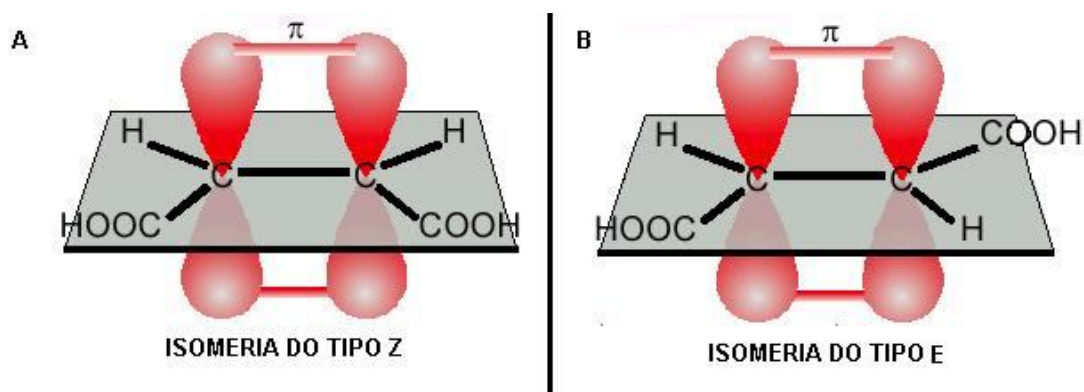
A geometria molecular geral (tamanho, forma e presença de grupos funcionais) é vital para assegurar que os carotenóides se posicionem nas estruturas celulares e subcelulares, no local e orientação corretos para permitir o funcionamento adequado. Os carotenóides são os responsáveis pelas cores de flores, sementes, frutas e alguns fungos. A cor exerce um importante papel na reprodução desses organismos: a coloração atrai animais que dispersam pólenes, sementes ou esporos. Além disso, os carotenóides são considerados juntamente com as clorofilas, os principais pigmentos envolvidos na fotossíntese (BRITTON, 1995; YOUNG & LOWE, 2001).

A cor produzida pelos carotenóides é devida a uma estrutura específica capaz de capturar a energia que é produzida pela excitação causada durante a transferência de um elétron de um orbital externo para outro de maior energia. A energia não-absorvida é refletida e/ou refratada para ser capturada pelo olho, e os impulsos neurais gerados são transmitidos para o cérebro onde podem ser interpretados como cor (DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000). Esta estrutura é conhecida como cromóforo e é caracterizada pela poliinsaturação (cadeia poliênica conjugada). O cromóforo consiste inteiramente num sistema conjugado de duplas ligações, isto é, uma seqüência de ligações C-C simples e duplas alternadas, onde os elétrons da cadeia linear são deslocados ou eventualmente compartilhados pela cadeia inteira. O resultado final é que a cadeia poliênica inteira é relativamente rica em elétrons. É possível haver até quinze ligações duplas conjugadas no cromóforo de um carotenóide, mas estruturas com sete a onze dessas ligações são mais comuns. As duplas ligações conjugadas são capazes de realizar reações químicas redox específicas que necessitam da sua estrutura rica em elétrons. Por um lado, o carotenóide perde um único elétron e se torna um cátion radical estabilizado por ressonância com carga resultante +1 distribuída na cadeia. Entretanto, a deslocação

dos elétrons não ocorre de maneira uniforme, e a densidade eletrônica é maior nas extremidades da molécula (estas são então, suas partes mais reativas). A perda ou modificação da cor dá um aviso imediato e sensível de decomposição ou modificação estrutural (SCHIEDT & JENSEN, 1995; WEEDON & MOSS, 1995; CARDOUNEL *et al.*, 2003).

A estrutura poliênica dos carotenóides os torna moléculas altamente reativas. Esta cadeia, rica em elétrons e susceptível ao ataque por reagentes eletrofílicos, também é responsável pela instabilidade dos carotenóides, isto é, a sua susceptibilidade a oxidação pelo ar ou peróxidos, adição de eletrólitos - incluindo H^+ e ácidos de Lewis, e a isomerização do tipo *E Z* (figura 1). Este tipo de isomerização é geométrica: uma dupla ligação vai unir duas partes residuais da molécula tanto na configuração *Z* (do alemão *Zusammen* = juntos) – que possui as duas partes no mesmo lado do plano, ou na configuração *E* (do alemão *Entgegen* = separados) – onde as duas metades estão em lados opostos do plano. Estes isômeros não diferem apenas quanto aos respectivos pontos de ebulição, solubilidades e estabilidades, mas também com respeito às afinidades de adsorção, cores (pico de absorção) e intensidades de cor causadas pelo calor, luz ou reagentes químicos (SCHIEDT, 1995; OLIVER & PALOU, 2000).

FIGURA 1 – ISOMERIZAÇÃO DO TIPO E/Z



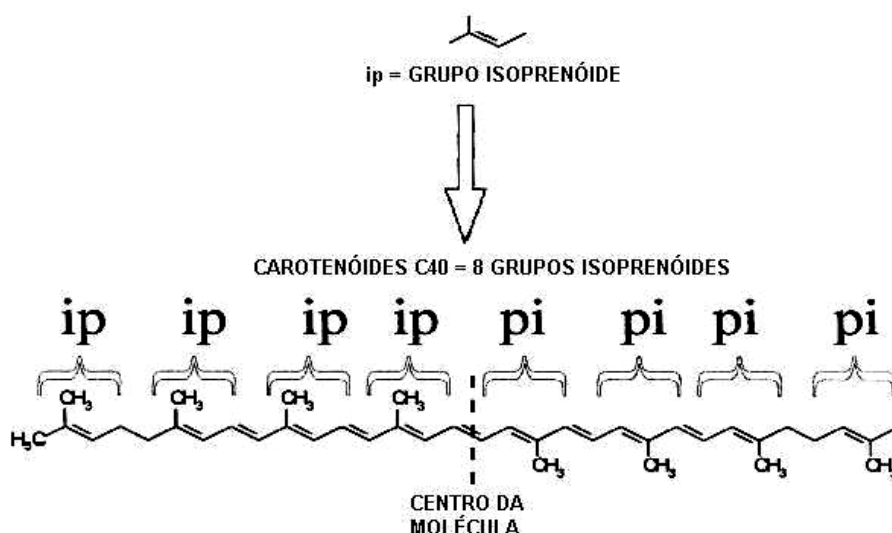
FONTE: ALMEIDA, 2004.

Os carotenóides e compostos relacionados com cadeias poliênicas menores (retinóides) são passíveis de rápida oxidação, em maior ou menor grau, pelo oxigênio molecular (auto-oxidação). Apesar de a pesquisa na química dos carotenóides estar se desenvolvendo rapidamente e da auto-oxidação ser o principal processo que leva à destruição desses polienos biologicamente ativos, o mecanismo envolvido ainda não é conhecido em detalhes. Vários estudos têm chegado a conclusões sobre os estágios iniciais do processo de auto-oxidação e vários produtos de oxidação formados têm sido determinados (FINKELSHTEIN *et al.*, 1999). Na sua maior parte são hidrocarbonetos bicíclicos poliinsaturados. Os carotenóides pertencem à ampla classe dos terpenóides, a qual também inclui substâncias como óleos essenciais, fitormônios e esteróides. Todos esses grupos compartilham uma origem biossintética comum que será descrita a seguir e têm um papel significativo no crescimento, propagação e nas funções metabólicas e ecológicas de diferentes organismos (LATSCHA, 1990).

1.1.3 Biossíntese, Metabolismo e Toxicidade dos Carotenóides

A maioria dos carotenóides são tetraterpenos (C_{40}) e, como tais, são sintetizados pela via dos isoprenóides. Eles podem ser visualizados como o resultado da junção de oito moléculas de isopreno (figura 2). A ligação destas moléculas é feita de maneira cabeça-cauda, em concordância com a clássica “regra do isopreno” (moléculas de isopreno podem reagir com outras moléculas de isopreno para formar blocos do tipo cabeça – cauda e cauda – cauda), exceto no centro da molécula onde a ordem é invertida, e então o esqueleto C_{40} é simétrico quando visto como um todo (WEEDON & MOSS, 1995; DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

FIGURA 2 – ESTRUTURA BÁSICA DOS CAROTENÓIDES



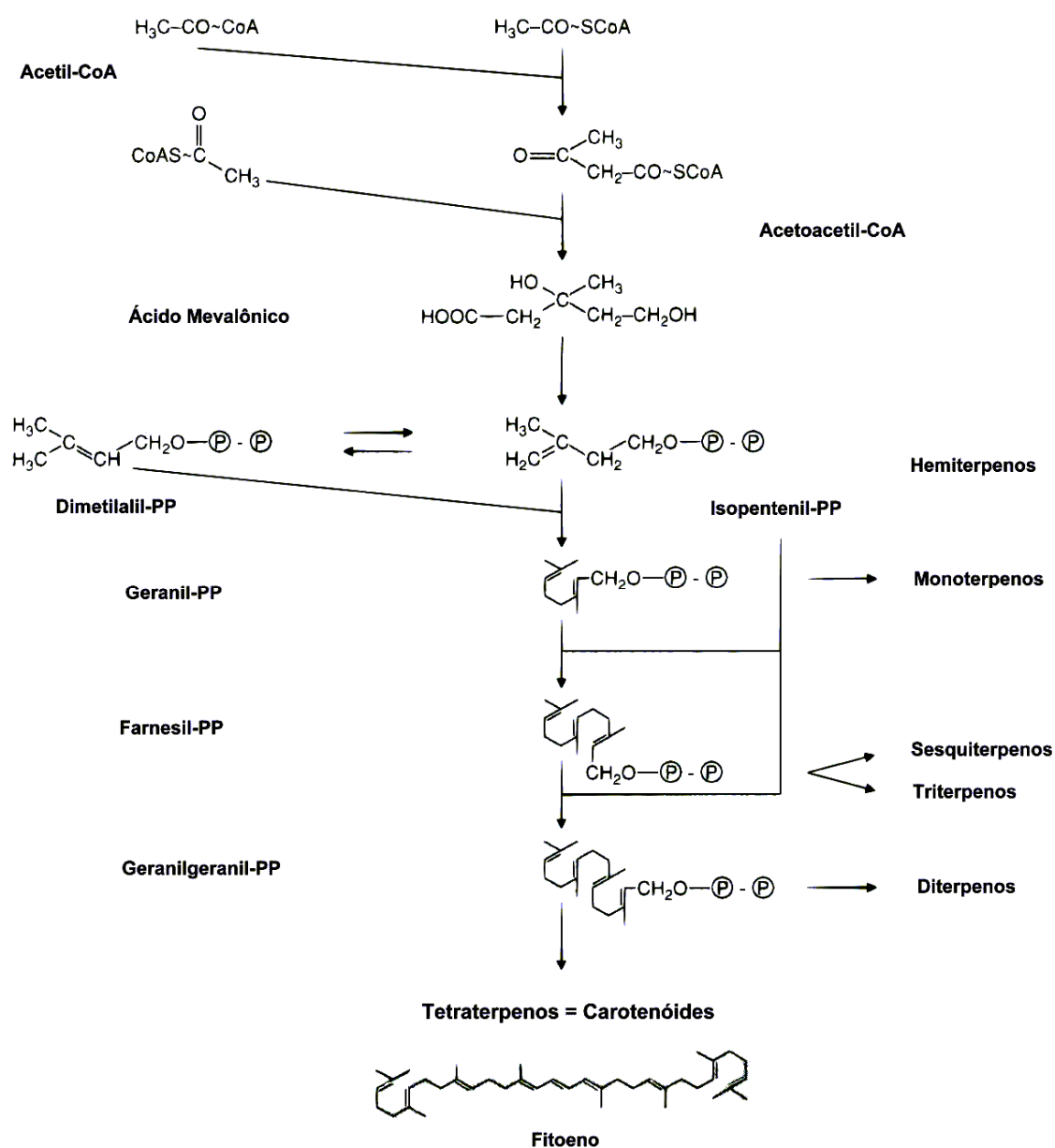
FONTE: DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000. – modificado pelo autor.

1.1.3.1 Biossíntese dos Carotenóides

O precursor dos terpenóides é o hidrocarboneto isopreno (C₅). Apesar de biogeneticamente os terpenóides derivarem do isopreno, ele *per se* não é o precursor dos terpenóides naturais porque este papel é realizado pela sua forma ativa – o isopentenil pirofosfato (IPP), que é formado a partir do ácido mevalônico via acetato, e que se encontra em equilíbrio com o seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP) nas células. O IPP biologicamente ativo é caracterizado por uma estrutura molecular assimétrica onde podem ser distinguidas uma parte “polar” (cabeça) e uma parte “apolar” (cauda). Em reações com outras moléculas de isopreno são formados blocos do tipo “cabeça-cauda” (forma regular) e “cauda-cauda” (forma irregular). A maioria das etapas da biossíntese dos carotenóides segue como regra que os mono-, sesqui- e diterpenos têm formas regulares e são caracterizados por estruturas assimétricas. Em contrapartida, os tetraterpenos são formados pela condensação irregular de duas unidades de geranilgeranil difosfato (GGPP) e, dessa forma, possuem uma estrutura molecular simétrica (LATSCHA, 1990).

A biossíntese dos carotenóides (figura 3) pode ser dividida em várias etapas: a) biossíntese do mevalonato; b) formação do IPP; c) formação do GGPP; d) biossíntese do fitoeno; e) formação do licopeno; f) formação do anel ionona dos carotenóides e g) formação de xantofilas. Todas estas etapas serão descritas nos parágrafos que seguem.

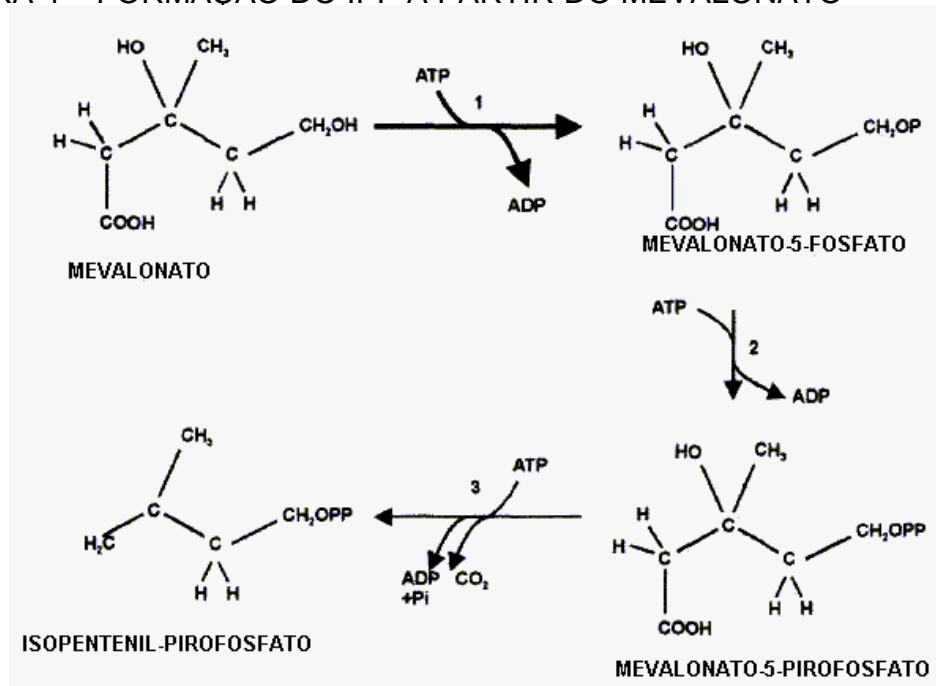
FIGURA 3 – ESQUEMA DA BIOSSÍNTESE DOS CAROTENÓIDES



Como o precursor biológico IPP é comum a vários compostos isoprenóides, mecanismos sofisticados de controle existem para garantir a produção de níveis apropriados destes compostos no contexto da via metabólica, estágios de desenvolvimento e condições ambientais. Os passos iniciais da via envolvem a fusão de três moléculas de acetil-CoA para produzir a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA). Em animais e leveduras estas reações são catalisadas por duas enzimas, a acetil-CoA transferase e a HMG-CoA sintase. A conversão do HMG-CoA para mevalonato é catalisada pela HMG-CoA redutase. Esta enzima é muito importante em animais, tendo sua atividade regulada. A atividade da HMG-CoA redutase já foi detectada no retículo endoplasmático e em mitocôndrias. Esta enzima catalisa dois passos de redução e usa o NADPH como cofator (DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

A síntese do IPP a partir do mevalonato é bem caracterizada em plantas (figura 4).

FIGURA 4 – FORMAÇÃO DO IPP A PARTIR DO MEVALONATO



FONTE: DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000. – modificado pelo autor

NOTA: As enzimas envolvidas na formação do IPP estão representadas por: 1 = mevalonato quinase; 2 = mevalonato-5-pirofosfato isomerase e 3 = mevalonato-5-pirofosfato descarboxilase.

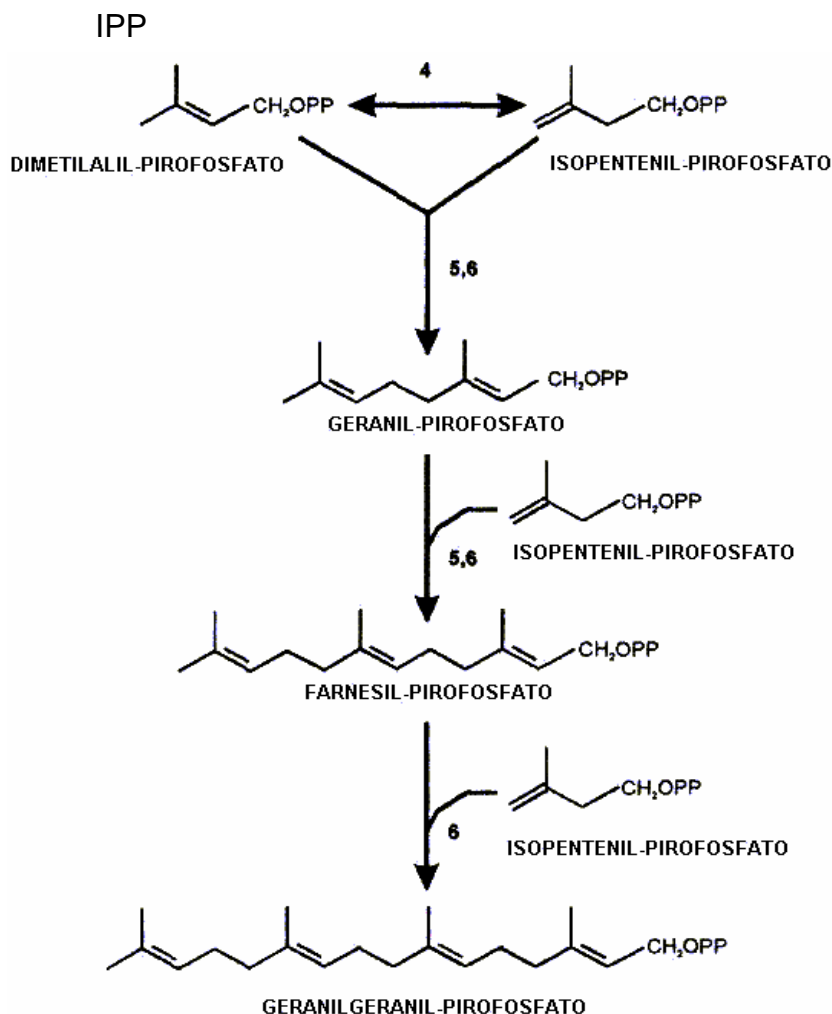
O mevalonato é fosforilado seqüencialmente por enzimas mevalonato quinases e depois pela mevalonato-5-pirofosfatase quinase para formar o 5-pirofosfomevalonato. Este composto sofre uma eliminação por descarboxilação catalisada pela pirofosfomevalonato descarboxilase que requer ATP e um cátion divalente. Estas atividades enzimáticas já foram caracterizadas em extratos de plantas e *in vivo*.

Parece que a mevalonato quinase é regulada por retro-inibição pelo fosfomevalonato e outros intermediários difosfato alílicos. Em 1997, foi proposta uma via alternativa para a síntese do IPP em cloroplastos de plantas superiores, que utiliza o piruvato e 3-fosfoglicerato (da via glicolítica) para obter o D-1-deoxi-xilulose-5-fosfato, que é re-estruturado em IPP. Entretanto, o IPP sozinho não é reativo o suficiente para iniciar as reações de condensação. Assim sendo, é necessária enzima IPP isomerase com um íon metálico divalente como cofator para a reação de isomerização do dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (LATSCHA, 1990; DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

O próximo passo é a condensação do IPP e DMAPP para formar o geranil pirofosfato – GPP (C₁₀). Duas moléculas de IPP são condensadas a GPP para obter o geranilgeranil pirofosfato (figura 5) – GGPP (C₂₀) por catálise pela GGPP sintase.

A enzima GGPP sintase necessita de dois íons Mg⁺² ou Mn⁺² por sítio catalítico. Estes íons reagem com o grupo pirofosfato do GPP e essa ionização leva a formação de um intermediário carbocátion com 15 carbonos que é atacado por outra molécula de IPP para formar o GGPP. Pelo fato do GGPP ser um precursor de muitos outros compostos (filoquinonas, tocoferol, ácido giberélico e diterpenos), é possível que a transformação do GGPP seja regulada por mecanismos complexos e é possível que seja compartimentalizada. Esta hipótese é sustentada pela existência de múltiplos genes da GGPP sintase em *Arabidopsis* (LATSCHA, 1990; DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

FIGURA 5 – FORMAÇÃO DO GERANILGERANIL PIROFOSFATO A PARTIR DO

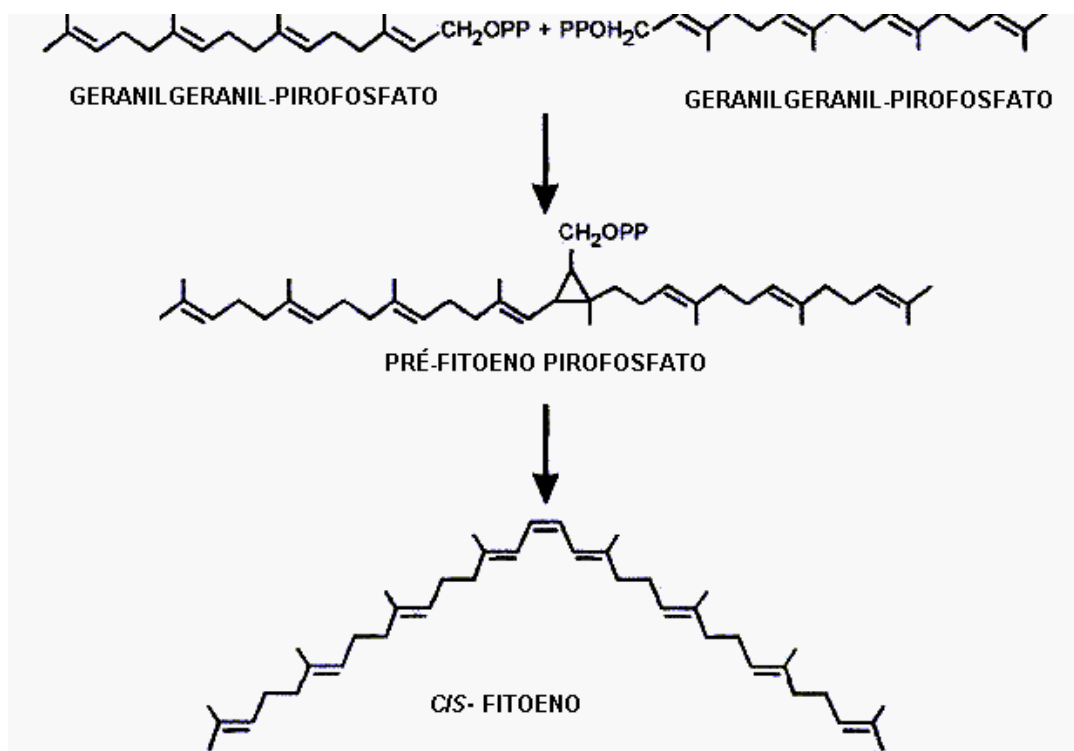


FONTE: DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000.– modificado pelo autor

NOTA: As enzimas envolvidas na formação do geranylgeranyl pirofosfato estão representadas por: 4 = isopentenil pirofosfato isomerase; 5=farnesil pirofosfato sintase e 6 = geranylgeranyl pirofosfato sintase.

O primeiro passo para a síntese específica dos carotenóides (figura 6) é a condensação de duas moléculas de GGPP ao *cis*-fitoeno (C₄₀). A reação possui o pré-fitoeno pirofosfato (PFPP) como um intermediário. Em tomates e pimentas já foi demonstrado que a enzima fitoeno sintase catalisa estes passos. Neste mecanismo, duas moléculas de GGPP são condensadas, sendo que inicialmente um hidrogênio e um dos grupos pirofosfato são produzidos para obter o PFPP. Logo após, a molécula do PFPP é re-arranjada para formar o fitoeno (DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

FIGURA 6 – BIOSSÍNTESE DO FITOENO



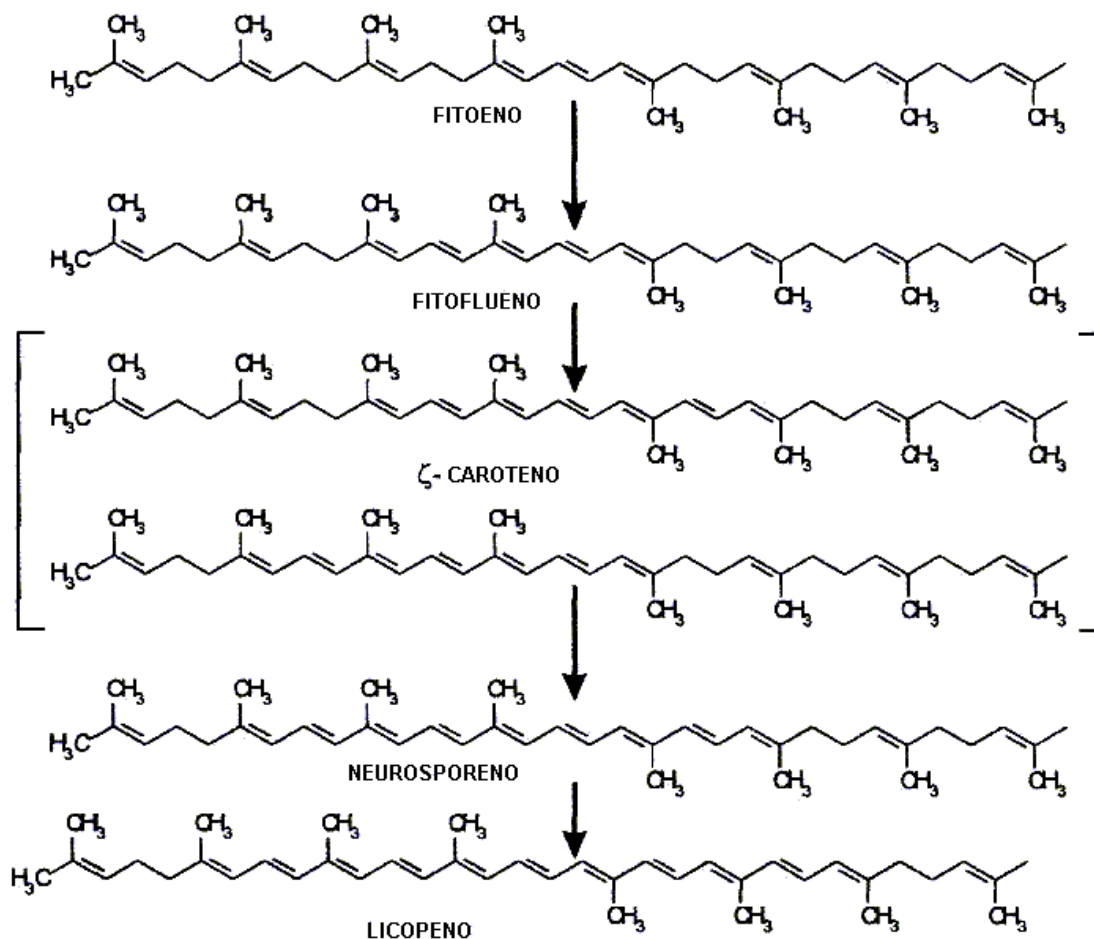
FONTE: DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000.— modificado pelo autor.

Muitos dos organismos (especialmente plantas superiores, algas e fungos) sintetizam o 15,15-*cis*-fitoeno. Esta é a estrutura básica dos carotenóides e as reações subseqüentes envolvem transformações desta estrutura. Entretanto, a maioria dos carotenóides possui a configuração *trans*, e parece que a transformação *cis/trans* não requer nenhuma isomerase específica (DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

A partir da molécula básica do fitoeno, dessaturações seqüenciais levam ao fitoflueno, ξ -caroteno, neurosporeno e ao carotenóide alicíclico licopeno, o pigmento vermelho dos tomates (figura 7). Já foi estabelecido que o ferro pode ter um papel importante no transporte de elétrons envolvido na dessaturação do fitoeno. Todos os carotenóides podem ser considerados como derivados do licopeno por reações que envolvem hidrogenação, desidrogenação, ciclização, inserção de oxigênio, migração

da dupla ligação, migração de grupos metil, alongação da cadeia e encurtamento da cadeia (LATSCHA, 1990; DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

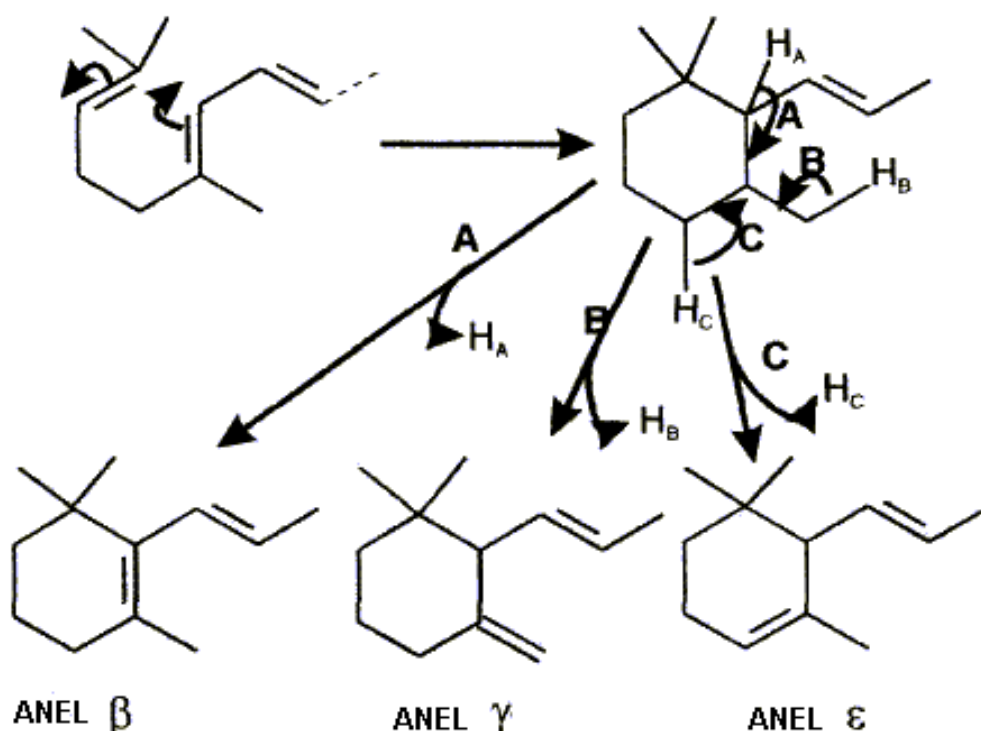
FIGURA 7 – REAÇÕES DE DESSATURAÇÃO PARA FORMAÇÃO DO LICOPENO



FONTE: DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000.— modificado pelo autor.

O licopeno, como outros carotenóides na seqüência biológica de biossíntese, é acíclico. Ele é convertido em β- ou ε-caroteno por enzimas chamadas de licopeno ciclases. A reação de ciclização deste composto (figura 8) começa com a formação de um íon carbânion e a sua subsequente estabilização pela eliminação de um dos três átomos de hidrogênio. Isto resulta em carotenóides com anéis do tipo β e γ e ε (LATSCHA, 1990).

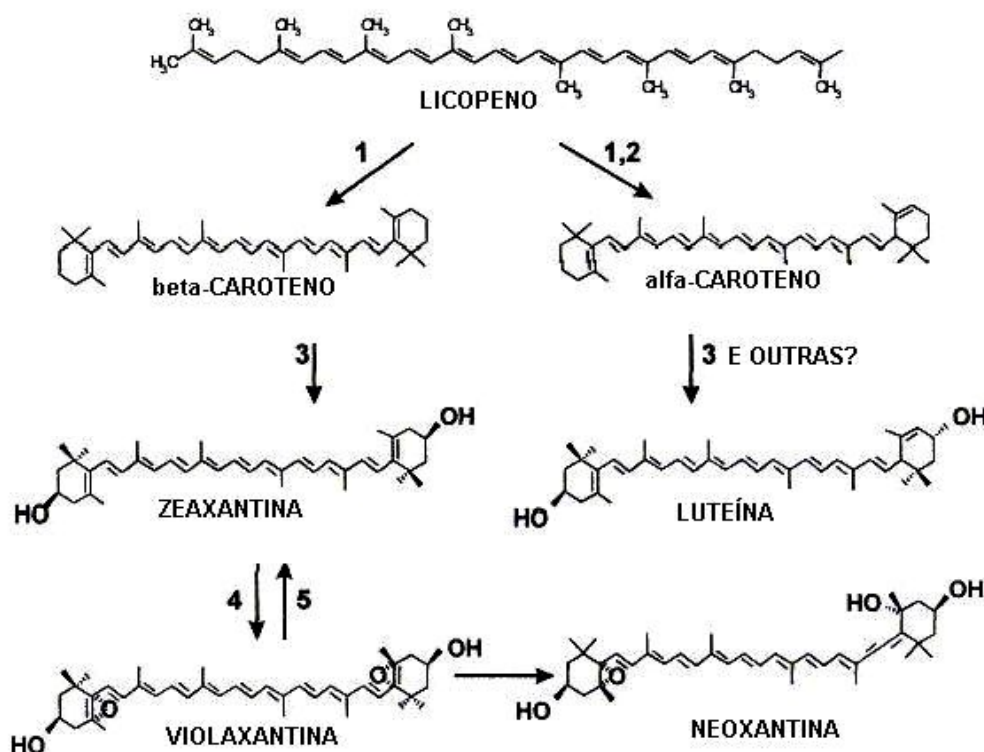
FIGURA 8 – MECANISMO PROPOSTO PARA A FORMAÇÃO DO ANEL IONONA DOS CAROTENÓIDES



FONTE: DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000.– modificado pelo autor.

Até este ponto, apenas carotenóides não-substituídos foram produzidos. A inserção de átomos de oxigênio na molécula de caroteno e rearranjos subsequentes leva a formação das xantofilas (LATSCHA, 1990). Conforme pode ser evidenciado pela figura 9, as xantofilas mais simples são formadas a partir de carotenóides cíclicos (α - ou β -caroteno, por exemplo) pela hidroxilação nas posições 3 e 3' do anel ioneno, seguida por epoxidação nas posições 5, 6 e 5', 6'.

FIGURA 9 – EXEMPLOS DE REAÇÕES DE FORMAÇÃO DE XANTOFILAS



FONTE: DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000. – modificado pelo autor.

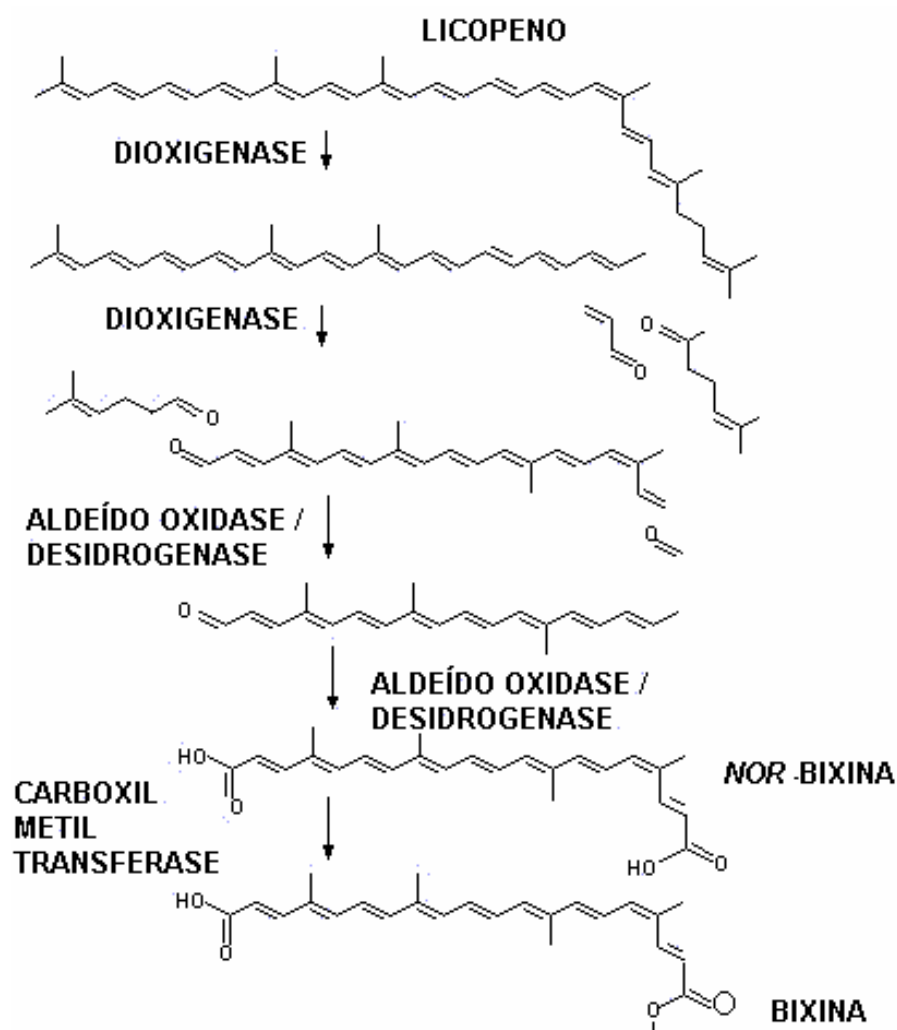
NOTA: Algumas das enzimas envolvidas estão representadas pelos números: 1 = β -licopeno ciclase; 2 = ϵ -licopeno ciclase; 3 = β -caroteno hidroxilase; 4 = zeaxantina epoxidase; 5 = violaxantina de-epoxidase.

A regulação da biossíntese dos carotenóides é complexa, como observada para a maioria dos terpenóides sendo que a regulação parece ocorrer em vários níveis. Evidências mostram que a biossíntese dos carotenóides é restrita a tecidos específicos, onde eles são utilizados. Carotenóides são produzidos em cromoplastos de frutas durante o processo de maturação (regulação órgão-específica). As enzimas da biossíntese dos carotenóides, e outras proteínas relacionadas são funcionais em cloroplastos e cromoplastos, mas são codificadas por genes nucleares então, os precursores correspondentes são importados pós-transcricionalmente. Isto pode sugerir a existência de um controle transcricional e pós-transcricional da via (DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

Muito pouco é conhecido sobre a biossíntese da bixina e da *nor*-bixina (figura

10), a forma não ácida da bixina, ou seja, os carotenóides oxigenados ou mais precisamente duplamente carboxilados presentes na testa das sementes de *Bixa orellana*, o urucum.

FIGURA 10 - VIA PROPOSTA PARA A BIOSSÍNTESE DA BIXINA E DA NOR-BIXINA



FONTE: JAKO *et al.*, 2002 – modificado pelo autor.

Existe um pequeno número de genes estruturais envolvidos na biossíntese da bixina, começando pela via principal dos carotenóides. Estes genes podem ter similaridade com aqueles que envolvem dioxigenases, aldeído oxidases, aldeído desidrogenases e metiltransferases. Esta via é suportada por produtos derivados da

quebra do licopeno que se acumulam em quantidades muito pequenas nas sementes do urucum e também pela recente caracterização de dioxigenases de plantas que clivam cromóforos de carotenóides em locais específicos (JAKO *et al.*, 2002; BOUVIER *et al.*, 2003). A via para a biossíntese da bixina e da *nor*-bixina envolve duas quebras por uma dioxigenase (ou duas) de um carotenóide acíclico (qualquer um parecido com o licopeno), para formar grupos aldeídos. Estes grupamentos são oxidados a grupos carboxílicos e um deles é metilado. Em algum ponto deste processo, uma isomerização simples do tipo *cis-trans* da dupla ligação no carbono nove ocorre. Através de análises químicas, também se pode confirmar esta via através de achados de produtos relacionados como o metil-(9'Z)-apo-6'-licopenoato e o metil-(9Z)-61-oxo-6,6'-diapocarotenoato no urucum (JAKO *et al.*, 2002).

1.1.3.2 Metabolismo

As fontes mais comuns de carotenóides dietéticos incluem vegetais e frutas, e uma dieta rica nestes alimentos parecem proteger o organismo humano contra doenças como a aterosclerose, câncer e a degeneração macular relacionada com a idade (CANTRELL *et al.*, 2003).

Com algumas poucas exceções, os primatas e os ruminantes são os únicos animais que acumulam quantidades significantes de carotenóides. O primeiro grande avanço que houve no entendimento do papel dos carotenóides na bioquímica dos vertebrados, veio dos estudos da vitamina A. A deficiência desta vitamina em mamíferos (conhecida como cegueira noturna) era prevenida pelo consumo de fígado ou plantas verdes. Mas as plantas verdes não possuem nenhum tipo de vitamina A pré-formada, em contraste com sua abundância no fígado. Esta observação levou à hipótese de que os animais de alguma forma eram capazes de converter os carotenóides em vitamina A, via esta que foi gradualmente elucidada

entre 1935 e 1970 (HANDELMAN, 2001).

Os carotenóides encontrados em maior quantidade no plasma humano são o α -, β -caroteno, licopeno, criptoxantina e a luteína. Eles são quase que exclusivamente encontrados associados a lipoproteínas. Em termos de composição geral de carotenóides no organismo, os maiores órgãos de estocagem destas substâncias são o fígado e o tecido adiposo. A maioria dos carotenóides com atividade de pró-vitamina A obtidos da dieta são hidrolisados a retinal e outros produtos por enzimas de clivagem do β -caroteno, tanto no lúmen intestinal quanto nas células de borda em escova do intestino delgado. O retinal é reduzido a retinol, que é então re-esterificado nas células de borda em escova e incorporados a partículas de quilomícrons. Estas são parcialmente degradadas por ação de lipases nos tecidos extra-hepáticos para formar fragmentos de quilomícrons que contêm virtualmente todo o complemento original dos ésteres de retinil. Estes ésteres são então retirados dos fragmentos de quilomícrons por células hepáticas e enzimaticamente clivados em endossomos para formar a vitamina A livre. Esta vitamina pode ser re-esterificada no retículo endoplasmático, e transferida para células *stellate* para armazenamento ou excretada pelas células. Os carotenóides que são absorvidos intactos pela mucosa intestinal são incorporados em quilomícrons e transportados pelo plasma associados a partículas de lipoproteínas. No plasma sanguíneo eles aparecem inicialmente nos quilomícrons e frações VLDL (*very low density protein* = lipoproteína de densidade muito baixa), enquanto os níveis em outras lipoproteínas como HDL (*high density lipoprotein* = lipoproteína de densidade alta) e LDL (*low density lipoprotein* = lipoproteína de densidade baixa) aumentam em 24 – 48 horas. O seu consumo e distribuição celular variam entre as espécies e os processos envolvidos ainda são pobremente entendidos (ROUSSEAU *et al.*, 1992; STAHL & SIES, 1996; PALACE *et al.*, 1999).

Estudos metabólicos já foram realizados e mostraram que os pigmentos do urucum são satisfatoriamente metabolizados. Pode ser observado que em ratos, a

bixina lipossolúvel, a suspensão de bixina em óleo, e a *nor*-bixina podem ser detectadas no sangue em poucas horas após a administração de uma única dose oral. O nível dos pigmentos no sangue diminui durante as 24 horas seguintes, o que sugere que o organismo é capaz de metabolizar estes pigmentos. Em humanos, esses pigmentos também podem ser detectados no sangue e em poucas horas diminuem para valores próximos a zero. Estudos *in vitro* sugerem que estes carotenóides são absorvidos pelo intestino e metabolizados pelo fígado (PRESTON & RIKCARD, 1980).

1.1.4. Carotenóides Naturais *versus* Carotenóides Sintéticos

Os pigmentos podem ser classificados pela sua origem como naturais, sintéticos ou inorgânicos. Os pigmentos naturais são produzidos por organismos vivos como plantas, animais, fungos e microorganismos. Os pigmentos sintéticos são obtidos em laboratórios. Tanto os pigmentos naturais quanto os sintéticos são compostos orgânicos. Os pigmentos inorgânicos podem ser encontrados na natureza ou reproduzidos por síntese química (DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

Através de todo o mundo, o uso de colorantes alimentares do tipo natural continua a aumentar. Muitos consumidores acreditam que a cor natural é menos danosa e sendo assim, mais aceitável do que os corantes sintéticos (LANCASTER & LAWRENCE, 1996). Os corantes naturais têm sido utilizados por muitos anos. Pequenas quantidades desses pigmentos são adicionadas aos alimentos para aumentar a cor natural ou para ressaltar uma cor que, apesar de não natural no produto, provoca uma maior aceitação deste pelos consumidores. Os consumidores ativistas revisaram seus conceitos de saúde e os fabricantes começaram a produzir alimentos mais saudáveis. As fábricas de alimentos passaram a utilizar as características nutricionais dos alimentos como ferramenta de venda, uma estratégia que se tornou sucesso; dessa forma criou-se uma nova tendência mundial de uso de

colorantes naturais. Na atualidade, a maioria das pessoas interpreta o conteúdo dos produtos químicos como um contaminante, e esta tendência vem sendo reforçada e tudo parece indicar que continuará no futuro. Apenas para enfatizar a situação, deve-se apontar que até 1986 cerca de 350 patentes de corantes naturais tinham sido registradas e para os colorantes sintéticos este número era de 71. Hoje em dia, o número de vantagens dos corantes naturais sobre os sintéticos tem aumentado por causa das propriedades farmacológicas dos pigmentos naturais. Em 1994, o mercado de corantes naturais tinha um valor estimado de 250 milhões de dólares, e 65% dele correspondiam aos aditivos alimentares, com uma taxa de crescimento anual de 5% a 10% em relação aos 3% a 5% de pigmentos sintéticos. Entretanto, é necessário ressaltar que os corantes sintéticos têm vantagens bem conhecidas sobre os naturais baseadas na sua maior força de pigmentação, estabilidade, armazenamento, facilidade no processo e pelo fato de serem mais baratos e disponíveis em quantidades ilimitadas (MÍNGUEZ-MOSQUERA *et al.*, 1995).

1.1.4.1 Toxicidade de corantes sintéticos e naturais

Em anos recentes, tem-se manifestado uma consciência crescente em torno das características possivelmente tóxicas de muitos corantes. Essa tendência tem-se refletido em muitos países, mediante o ajuste gradativo da sua utilização em produtos alimentares, cosméticos e medicinais (FRANKEL, 1996; LANCASTER, & LAWRENCE, 1996; FIRACE, 2002). Testes toxicológicos realizados em diversos países, com vigilância da Organização Mundial de Saúde (OMS) comprovaram que, dependendo do tipo, estes aditivos coloridos causam efeitos colaterais como alergias, disritmias cardíacas, problemas circulatórios, gástricos e oftalmológicos, distúrbios da tireóide, câncer e mutações gênicas. O debate em torno do uso desses aditivos concentra-se, sobretudo, nos corantes sintéticos, atualmente os mais usados pela indústria alimentícia (FIRACE, 2002).

Apesar de todos os aditivos corantes serem diferentes em termos de regulação pelo FDA (*Food and Drug Administration*), eles podem ser divididos em duas classes: os aditivos corantes certificados (sintéticos) e os aditivos corantes que não necessitam de certificação (naturais). Estes últimos são vastamente utilizados, principalmente em alimentos e o FDA geralmente coloca poucas restrições ao seu uso (HALLAGAN *et al.*, 1995).

1.1.4.1.1 Toxicidade de corantes sintéticos

No Brasil, em 1987, a DINAL (Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos), pela portaria número 17, proibiu a utilização dos seguintes corantes sintéticos: amarelo ácido, azul de indatreno, vermelho sólido E, escarlate GN e laranja GCN. Apenas os corantes amarelo crepúsculo, azul brilhante FCF, bordeaux S ou amaranto, eritrosina, indigotina, ponceau 4R, tartrazina e vermelho 40 tiveram a autorização mantida. Com base nesses aspectos e frente à necessidade de substituir vários corantes artificiais, a indústria de alimentos recorreu a uma série de pigmentos naturais, que vão desde partes comestíveis e sucos de vegetais, animais e insetos até substâncias extraídas e purificadas (FIRACE, 2002).

1.1.4.1.2 Toxicidade de corantes naturais

Com poucas exceções, os dados toxicológicos de corantes naturais não são tão bem definidos como os dados dos corantes sintéticos. Isto ocorre primariamente porque as investigações toxicológicas dos corantes certificados são dirigidas por necessidades regulatórias. A quantidade e a qualidade dos dados toxicológicos dos corantes naturais tem uma enorme variação. Alguns corantes como o caramelo, já foram extensivamente estudados, enquanto outros possuem apenas dados preliminares (HALLAGAN *et al.*, 1995).

A legislação brasileira com relação à adoção de corantes e outros aditivos

está respaldada nas recomendações do JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) que elaborou, ao lado das especificações de identidade e pureza, as condutas a serem observadas no trato dos estudos toxicológicos e as decisões sobre as avaliações toxicológicas. Para os corantes naturais a avaliação toxicológica deve ser considerada para três grupos: a) corante isolado de um alimento, quimicamente inalterado e usado no produto em níveis normalmente nele encontrados (este corante é aceito como se fosse ingrediente próprio do alimento, não sendo necessários dados toxicológicos); b) corante isolado de um alimento, quimicamente inalterado e usado no produto em níveis superiores aos normalmente nele encontrados (esse corante deve ser avaliado como se fosse artificial) e c) corante isolado de um alimento, quimicamente modificado durante a sua obtenção, ou então, extraído de outra fonte não alimentar (FIRACE, 2002).

1.1.5. Atividades Biológicas dos Carotenóides

As atividades biológicas dos carotenóides podem ser divididas em três categorias diferentes: funções, ações e associações. As funções devem ser definidas como papéis essenciais, pelo menos sob certas condições definidas (formação de vitamina A). A ausência completa do carotenóide então, leva a uma capacidade fisiológica prejudicada e, possivelmente, à morte. As ações devem ser consideradas como respostas fisiológicas ou farmacológicas à administração do carotenóide (atividade antioxidante, inibição da mutagenese, entre outras). As associações definem correlações entre os carotenóides e alguns eventos fisiológicos ou médicos (risco menor de câncer com o consumo aumentado de carotenóides) (BENDICH & OLSON, 1989).

Os carotenóides são considerados substâncias benéficas no combate a doenças relacionadas com a idade, como algumas formas de câncer (em especial o de pulmão), infartos, degeneração macular e catarata. Além disso, já foi determinado

que os carotenóides possuem um efeito marcante na resposta imune e na comunicação intercelular (ONG & TEE, 1992; DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

Em vários estudos o consumo de frutas e vegetais está associado com baixas taxas de incidência e mortalidade por câncer. Em experimentos com animais, os vegetais apresentaram efeitos antitumorogênicos. Também existe uma alta correlação negativa entre o consumo de frutas e vegetais frescos e a mortalidade por doenças do coração nos Estados Unidos. Esta proteção que frutas e vegetais proporcionam contra doenças vem sendo atribuída a seu variado conteúdo de antioxidantes, cuja natureza química é muito variada. A maior parte da capacidade antioxidante de uma fruta ou vegetal vem de compostos carotenóides e flavonóides (WANG, 1996).

No entanto, muitos estudos relacionam componentes dietéticos com a incidência de ausência de doença ou sintomas; dessa forma, esses estudos não podem estabelecer uma relação direta entre causa e efeito. Por outro lado, é bastante claro que os carotenóides em associação com outros componentes de frutas e vegetais possuem efeitos protetivos contra algumas doenças crônicas e condições pré-cancerosas (ONG & TEE, 1992; DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000). Atualmente, ainda parece prematuro anunciar conclusões a respeito do potencial papel dos carotenóides na terapia de doenças degenerativas. Entretanto, o consumo de frutas, vegetais e alimentos fortificados com antioxidantes deve ser encorajado.

Muitas das doenças citadas acima envolvem processos oxidativos mediados por radicais livres. Os carotenóides, através dos seus efeitos antioxidantes, podem inativar espécies químicas reativas como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e os radicais livres, podendo levar a algum tipo de benefício neste tipo de doença. Entretanto, essa função não está completamente demonstrada *in vivo* (ONG & TEE, 1992; DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

Vários mecanismos têm sido sugeridos para a proteção dos carotenóides em sistemas biológicos, os quais incluem a desativação de espécies ativadas

eletronicamente como o $^1\text{O}_2$ e a desativação de espécies químicas reativas como os radicais peroxil e alcoxil, que podem ser geradas dentro das células e iniciar reações oxidativas (PALLOZA & KRINSKY, 1992).

Os carotenóides fazem parte integral de membranas celulares. Os carotenos encontram-se imersos nas membranas, enquanto as xantofilas mostram uma posição variável nesta estrutura, pois seus grupos polares afetam sua posição e mobilidade. Conseqüentemente, os carotenos são capazes de reagir eficientemente apenas com radicais livres gerados dentro da membrana. Adicionalmente, sugere-se que os carotenóides influenciam a força e a fluidez da membrana, afetando assim a permeabilidade do oxigênio e outras moléculas (DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

O seqüestro do $^1\text{O}_2$ pelos carotenóides tem como fator principal o sistema de duplas ligações conjugadas, que está intimamente relacionado com as reações de transferência de energia, como aquelas encontradas na fotossíntese (YOUNG & LOWE, 2001).

1.1.5.1. Atividade Antioxidante dos Carotenóides

Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que o papel fotoprotetivo dos carotenóides está relacionado com a sua atividade antioxidante ou com a modulação de outros antioxidantes celulares. Também, foi estabelecido que a estrutura do carotenóide exerce grande influência na sua atividade antioxidante (por exemplo: cantaxantina e astaxantina mostram diferentes graus de atividade antioxidante do que o β -caroteno ou a zeaxantina).

Muitas das várias doenças humanas graves, incluindo câncer e doenças cardíacas, em algum estágio envolvem processos de oxidação mediados por radicais livres. Para ter propriedades antioxidantes os carotenóides precisam ser capazes de prevenir ou competir com as reações de oxidação que causam danos aos lipídeos e outros componentes celulares (BRITTON, 1995; WOODALL *et al.*,

1997).

1.1.5.1.1 Radicais Livres

Em 1950, os radicais livres eram compostos químicos aceitos fora do campo da Biologia. Até este ponto, muitos dos cientistas que estudavam os radicais livres estavam interessados na síntese orgânica. As necessidades da época da guerra mundial estimularam descobertas na química orgânica; por exemplo, reações em cadeia de radicais livres foram utilizadas para sintetizar o polietileno e foram investigadas as rotas da borracha sintética. As substâncias antioxidantes eram consideradas como agentes de quebra de reações em cadeia e inibidores da síntese de radicais livres. A segunda guerra mundial levou diretamente ao nascimento da bioquímica dos radicais livres. O envenenamento por radiação e as mutações induzidas por radiação foram dolorosamente demonstrados, e muito do esforço científico da II Guerra foi direcionado para explicar estes acontecimentos. Em 1954, foi publicado um artigo que especulava que os efeitos letais da radiação ionizante deveriam ser devidos aos radicais livres do oxigênio. Este manuscrito pode ser considerado como o início do conhecimento científico sobre radicais livres. Antes de 1970, muitos dos bioquímicos renomados duvidavam que os radicais livres pudessem contribuir no processo das “doenças naturais”. A maior razão para este ceticismo era a grande dúvida que existia se os oxi-radicais poderiam existir como entidades solúveis, exceto talvez sob condições de radiação ionizante extremamente intensas. Esta questão só foi superada quando se descobriu a superóxido-dismutase (SOD1), uma enzima cuja única função aparente era detoxificar o ânion radical superóxido. A presença desta enzima foi tida como uma prova indubitável de que oxi-radicais difusíveis biologicamente deveriam existir comumente na fase solúvel, e não meramente como espécies oxidantes raras ligadas a proteínas (HENSLEY & FLOYD, 2002).

De maneira simples, o termo radical livre refere-se a qualquer espécie capaz de existência independente que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Entre as espécies reativas de oxigênio temos aqueles que não são radicalares e temos alguns que são radicais livres (por exemplo: o ânion superóxido – $O_2^{\bullet-}$ - é um radical livre e o peróxido de hidrogênio não o é) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1996).

A importância de remover estas ERO de organismos vivos está se tornando cada vez mais reconhecida, junto com o crescente interesse nos mecanismos protetores onde antioxidantes que seqüestram tais substâncias podem ter um potencial elevado para uso terapêutico (UEDA, 1996).

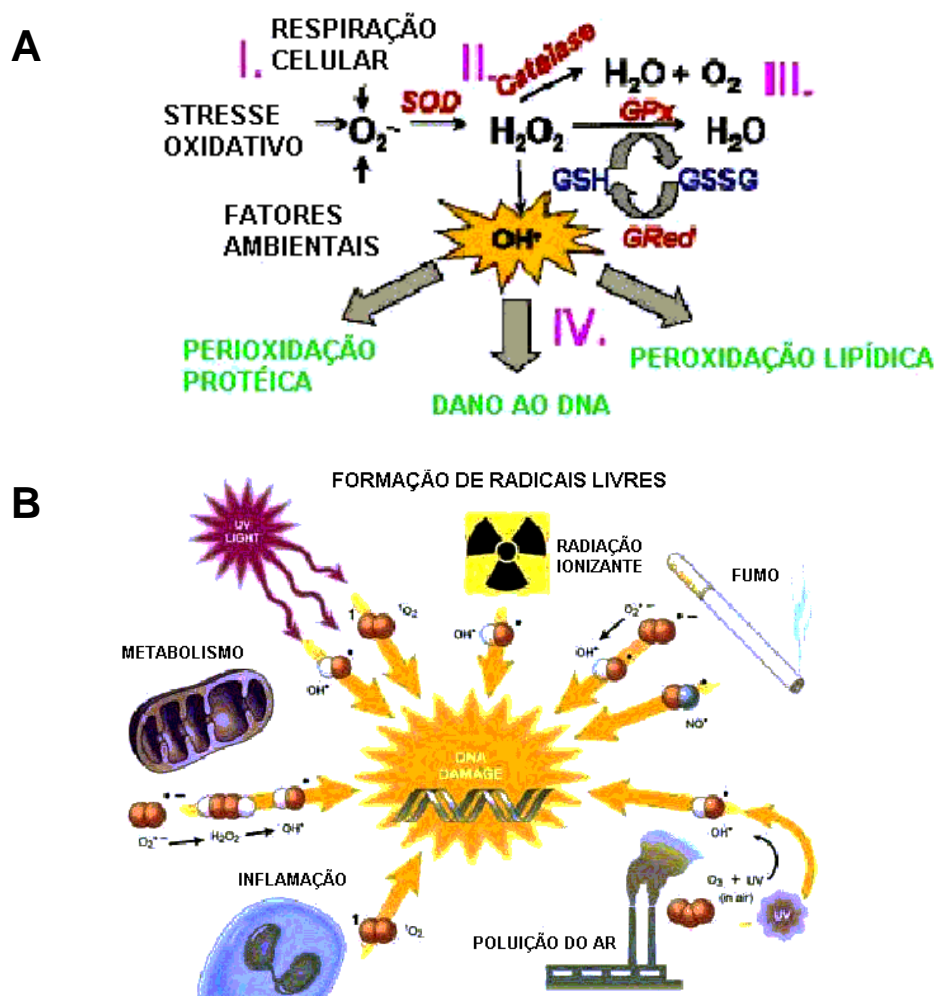
A formação de radicais livres geralmente envolve a fissão homolítica de ligações covalentes ou captura de elétrons. A homólise da ligação covalente requer um incremento de energia que pode ser provida por fontes térmicas, radiação eletromagnética ou por acoplamento de oxidação-redução com uma fonte de radicais livres (SLATER, 1972).

A presença de radicais livres em sistemas biológicos contendo lipídeos poliinsaturados e outro material susceptível à destruição oxidativa é potencialmente perigosa, porque o dano associado com a produção inicial dos radicais pode ser grandemente amplificado através de um mecanismo envolvendo radicais peroxil. Apesar desta reação em cadeia eventualmente se tornar auto-terminável, quando dois radicais peroxil combinam-se para formar produtos não-radicais, no decorrer dela pode ocorrer uma quantidade massiva de destruição de lipídeos não-saturados, dependendo do comprimento da cadeia. As reações em cadeia podem ser fortemente inibidas pela adição de pequenas quantidades de antioxidantes (BURTON, 1989).

A geração e as possíveis conseqüências patológicas do oxigênio singlete em sistemas biológicos (figura 11) tem sido descrita e esta molécula vem sendo claramente envolvida na inativação de proteínas, na peroxidação de lipídeos

biológicos e no dano ao DNA. Várias espécies reativas de oxigênio são geradas na célula como resultado de inúmeros processos metabólicos ou seguidos de exposição a xenobióticos. A formação do anion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) estão mostrados nesta figura. Já se demonstrou que todas estas espécies clivam o DNA, peroxidam lipídeos, alteraram a atividade enzimática, depolimerizam polissacarídeos e destroem células (PALOZZA & KRINSKY, 1992).

FIGURA 11 – FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES (A) E DANOS CAUSADOS AO ORGANISMO (B)



FONTE: ECKERT, J. P., 2004 – modificado pelo autor.

Já é bem conhecido que os radicais peroxil, por causa da sua seletividade nas reações e sua habilidade de ofender sistemas biológicos, são potencialmente mais perigosos do que vários outros tipos de radicais livres. Tem sido sugerido, que estas espécies possam estar implicadas na ação tóxica de muitos agentes químicos e ambientais, e podem estar conectados com uma variedade de eventos patológicos tais como: doenças cardíacas, câncer e o processo de envelhecimento. Há muitas evidências de que os carotenóides são muito eficientes em seqüestrar os radicais peroxil, mas o mecanismo da sua ação antioxidante não está ainda bem definido (PALOZZA & KRINSKY, 1992).

1.1.5.1.2 Atividade Antioxidante

Há um crescente interesse no papel da Nutrição na prevenção e na patogênese do câncer. Estudos epidemiológicos em humanos sugerem que o β -caroteno auxilia na prevenção do câncer (MASCHIO *et al.*, 1992).

Os mecanismos através dos quais os carotenóides podem agir como agentes protetores em células e organismos têm sido revistos e bem discutidos. Eles podem ser resumidos nas habilidades destas moléculas em agir tanto como agentes fotoprotetores contra os efeitos nocivos da luz e oxigênio quanto como compostos reativos contra espécies químicas geradas dentro das células e capazes de induzir o dano oxidativo (PALOZZA & KRINSKY, 1992; POLYAKOV *et al.*, 2001).

Vários mecanismos têm sido sugeridos para a proteção dada pelos carotenóides aos sistemas biológicos, os quais incluem a desativação de espécies eletronicamente ativas como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e a desativação de espécies químicas reativas como os radicais peroxil (ROO^\bullet) e alcoxil (ROH^\bullet), que podem ser gerados dentro das células e iniciar reações oxidativas. A ação antioxidante dos carotenóides vem sendo documentada em vários estudos *in vitro* e está relacionada com a estrutura química destes pigmentos insaturados. Além disso, evidências

diretas dos carotenóides funcionando *in vivo* têm sido reportadas em modelos animais, mostrando que sua proteção está relacionada tanto com a atividade antioxidante direta quanto pela modulação dos níveis de antioxidantes celulares (PALOZZA, 1992).

Um antioxidante biológico é definido como “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas com aquelas de um substrato oxidável, significativamente retarda ou previne a oxidação deste substrato”. Esta definição é bastante clara e cobre todos os tipos de antioxidantes que podem existir (BENZIE & STRAIN, 1996; PRIOR & CAO, 1999).

A redução de uma substância é definida como o ganho de elétrons, e a oxidação como a perda de elétrons. Um agente redutor é aquele que doa elétrons e, dessa forma, leva um outro reagente a ser reduzido. Um agente oxidante é aquela substância que aceita elétrons e leva outro reagente a ser oxidado. Qualquer tipo de oxidação é impossível de acontecer sem a redução de algum composto no sistema. Quando a redução e a oxidação caracterizam uma reação química, esta é chamada de reação redox. As reações do tipo redox são o coração das oxidações biológicas, a cadeia de reações químicas que utilizam o oxigênio do ar para oxidar compostos da degradação do alimento para prover energia (PRIOR & CAO, 1999).

A menos que um antioxidante previna a geração de ERO, uma reação do tipo redox ainda irá ocorrer. A diferença é que as espécies oxidáveis reagem com o antioxidante ao invés de reagir com o substrato, isto é, o antioxidante reduz o oxidante. Em termos mais simples, antioxidantes não-enzimáticos como o ácido ascórbico, podem ser descritos como substâncias redutoras, e a inativação dos oxidantes pelos agentes redutores pode ser descrita como uma reação redox na qual espécies reativas são reduzidas às custas da oxidação de outras. Neste contexto, a força antioxidante pode ser referida como a habilidade redutora (BENZIE & STRAIN, 1996).

A descoberta de que os carotenóides desativavam o oxigênio singlete foi um

importante avanço no entendimento dos efeitos biológicos dos carotenóides. O mecanismo pelo qual os carotenóides protegem sistemas biológicos contra o dano mediado pelo $^1\text{O}_2$ parece ser vastamente dependente do seqüestro físico, e tem uma extensão muito menor no processo químico (MASCHIO *et al.*, 1992). A eficácia do processo físico excede a do químico e envolve a transferência de energia de excitação do oxigênio singlete para o carotenóide, resultando em oxigênio no estado fundamental e carotenóide excitado no estado triplete. A energia é dissipada através de interações rotacionais e vibracionais entre o carotenóide excitado e o solvente do ambiente, resultando em carotenóide e energia térmica. No processo de seqüestro físico, o carotenóide permanece intacto e pode realizar vários ciclos de seqüestro (STAHL & SIES, 1996).

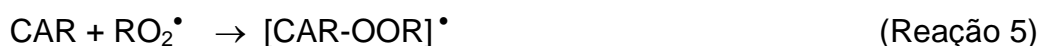
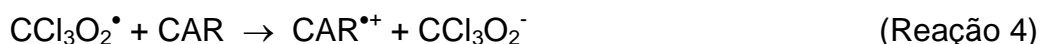
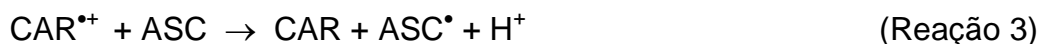
As pesquisas sobre a atividade antioxidante dos carotenóides foram impulsionadas pela descrição das suas propriedades de seqüestrar o oxigênio singlete e radicais peroxil. Este seqüestro pode ocorrer por vias físicas ou químicas. As substâncias antioxidantes podem agir através da doação de elétrons ou de átomos de hidrogênio. Em solventes não-polares os carotenóides devem agir como doadores de átomos de hidrogênio. Alguns estudos também demonstram que, em determinadas condições, o carotenóide pode agir como pró-oxidante (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1996).

Radicais oxidantes podem reagir com carotenóides por transferência de energia, como na reação entre dióxido de nitrogênio e β -caroteno, produzindo um cátion radical (Reação 1).

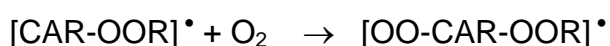
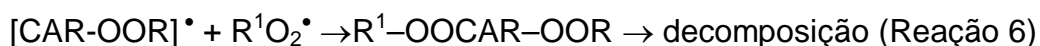


O elétron livre no cátion radical carotenóide pode ser estabilizado por estruturas de ressonância nas quais o elétron é delocalizado por elétrons π na cadeia poliênica da molécula do carotenóide. O radical cátion formado pode seguir

vários caminhos: dismutação, ocorrendo o término da propagação do radical (Reação 2), reações com o ascorbato (Reação 3), reações com outros radicais peroxil (Reação 4) ou reações de adição (Reação 5).



Os produtos da reação de adição podem interceptar outros radicais ou reagir com O_2 para formar um radical peroxil (Reação 6). O cátion radical carotenóide pode sofrer uma reação de dismutação. Estruturas de carotenóides diferentes irão implicar em habilidades também diferentes de participação nas reações de transferência de elétrons (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1996; BAST *et al.*, 1998).



Os carotenóides também podem reagir com radicais hidroxila (OH^{\bullet}) e, talvez com outras espécies, por doação de um átomo de hidrogênio (Reação 7). Os radicais formados nesta reação são pouco estáveis por causa do seu extenso deslocamento eletrônico. Dessa forma, a reação com O_2 para formar o radical peroxil é lenta (Reação 8). O radical formado pode então reagir com outro radical, formando um produto não-radical (Reação 9). Radicais como os das reações 6 e 8 podem propagar reações em cadeia de radicais livres como a peroxidação lipídica por abstrair um hidrogênio.





O radical OH^\bullet pode ser formado como um intermediário ativo, via oxidação do íon ferroso pelo peróxido de hidrogênio (Reação 10 – Reação de Fenton). Numerosos íons metálicos e seus complexos, nos seus estados de oxidação mais baixos – Fe (II), Cu (I), Ti (III), Cr (II), Co (II) – possuem os requisitos necessários de reagentes de Fenton e então, a mistura desses compostos metálicos com H_2O_2 irá gerar o radical OH^\bullet (GOLDSTEIN, 1993).



A formação dos radicais peroxil (RO^\bullet) é o maior passo na propagação em cadeia da peroxidação lipídica, mas também podem ser formados em sistemas não-lipídicos como as proteínas. Os antioxidantes capazes de remover este tipo de radical precisam ser efetivos em fase aquosa (com radicais de DNA e proteínas), mas também podem atuar na fase hidrofóbica, como no caso dos inibidores da peroxidação lipídica (HALLIWELL *et al.*, 1995).

Os carotenóides podem proteger as células do estresse oxidativo por seqüestrarem radicais livres capazes de causar dano celular. Os lipídeos não-saturados nas membranas celulares são o alvo primário para reações com radicais livres. Um ataque assim mediado pode iniciar uma cadeia de reações que resulta primeiro na peroxidação lipídica e posteriormente em significativos danos funcionais a membranas, enzimas e ácidos nucleicos (BENDICH & OLSON, 1989)

Sob a designação de ensaios armadilhas (*trap assays*), podem-se encontrar um conjunto de testes de inibição destinados à avaliação da capacidade seqüestradora de radicais livres “gerados” *in vitro*. Os diversos métodos propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais livres gerados, ao indicador de

oxidação escolhido e ao método usado para a sua detecção e quantificação. Na maioria dos casos, recorre-se à formação de radicais instáveis, pela decomposição térmica de azoiniciadores, os quais reagem rapidamente com o oxigênio originando radicais peróxil. Estes atuam sobre um substrato lipídico desencadeando um processo de lipoperoxidação, em relação ao qual se escolhe um determinado indicador (consumo de oxigênio, desaparecimento do substrato lipídico, aparecimento de produtos de oxidação) que se observa e quantifica antes e após a adição de um composto antioxidante (avaliação da capacidade seqüestradora). Alguns autores propõem um outro tipo de teste que não recorre à oxidação de substratos lipídicos, mas à redução de radicais livres estáveis gerados *in vitro*, como resultado da atividade seqüestradora de compostos antioxidantes (DPPH – α - α -difeníl- β -picrilhidrazil, ABTS – sal diamônico do ácido 2,2'-azonobis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico). Encontram-se igualmente referenciados alguns ensaios cinéticos tendo por base a formação *in vitro* do radical superóxido ou do radical hidroxila (SILVA *et al.*, 1999).

Alguns radicais são extraordinariamente não-reativos e estáveis, mesmo em soluções a temperatura ambiente. Um bem conhecido exemplo desses radicais é o DPPH[•], que é estável no estado sólido e em solução por longos períodos e apresenta uma forte coloração violeta ($\lambda_{\text{máx}}$ em 517 nm). Quando em reação com a vitamina E, o DPPH[•] é reduzido na proporção de 2 : 1 (DPPH[•] : vitamina E). Já foi encontrado que este radical é capaz de oxidar a cisteína, glutatona, ácido ascórbico, tocoferol, compostos polihidroxiaromáticos e aminas aromáticas. Ele não possui um potencial redox alto o suficiente para oxidar a glucose, não oxida purinas, pirimidinas ou compostos aromáticos com apenas um grupo hidroxila (BLOIS, 1958).

Vários estudos têm mostrado que, sob certas condições, os carotenóides podem agir como antioxidantes do tipo que impedem a cadeia de reações, através do seqüestro e desativação dos radicais livres tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A atividade antioxidante dos carotenóides em soluções orgânicas está relacionada

com a concentração de oxigênio, a estrutura química do carotenóide e a presença de outros antioxidantes (KIOKIAS & GORDON, 2003).

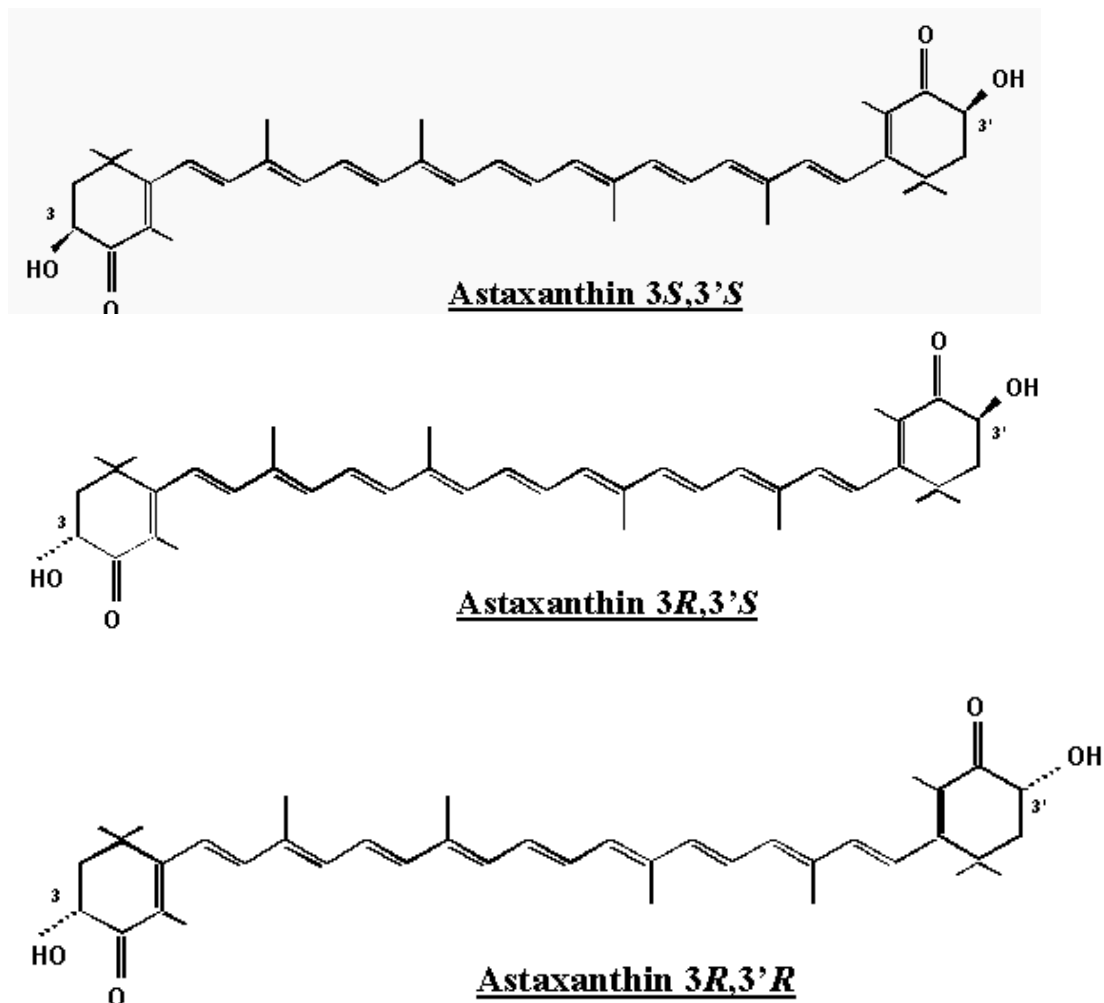
1.2 CAROTENOIDES – ASPECTOS ESPECIFICOS

A habilidade dos carotenóides em seqüestrar o oxigênio singlete está relacionada com o número de duplas ligações conjugadas, com o máximo de proteção mostrada por pigmento com nove ou mais ligações, e a estrutura do pigmento. A natureza e a posição dos grupos substituintes da molécula do carotenóide podem também governar sua habilidade antioxidante. A reatividade do número de carotenóides com ERO foi estudada e as diferenças encontradas entre as moléculas mostraram-se estar relacionadas com a densidade eletrônica. Por exemplo, o efeito provocado pelos grupos ceto nas posições C₄ na astaxantina e cantaxantina ou os grupos hidroxila na zeaxantina e isozeaxantina reduz sua reatividade pela prevenção da abstração dos átomos de hidrogênio dessas posições (MASCHIO *et al.*, 1989; MASCHIO, 1991; PALOZZA & KRINSKY, 1992; STAHL & SIES, 1996; YOUNG & LOWE, 2001). Sendo assim, parece imprescindível fazer algumas colocações sobre alguns carotenóides que serão discutidos neste trabalho.

1.2.1 Astaxantina

A astaxantina – 3,3'-dihidroxi- β - β -caroteno-4,4'-diona (figura 12) ocorre nos reinos vegetal e animal. É a base do produto comercializado pela empresa Hoffmann-la Roche – Carophyll Pink 8%®.

FIGURA 12: ESTRUTURA QUÍMICA DOS ISÔMEROS DA ASTAXANTINA



FONTE: MERA PHARMACEUTICALS, 2002.

Este carotenóide sintetizado quimicamente possui peso molecular de 596,86 g/mol e absorção máxima em ciclohexano de 472 nm, com um coeficiente de extinção molar de $2100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (LATSCHA, 1990). A astaxantina também pode ser encontrada como um pigmento vermelho de ocorrência natural em uma grande variedade de organismos vivos. Em adição às fontes naturais, a astaxantina também pode ser quimicamente sintetizada, produto este que é atualmente a maior fonte deste pigmento utilizada na alimentação de peixes. A astaxantina possui dois centros quirais ou assimétricos. Esses centros são constituídos pelos carbonos 3 e 3' nos dois anéis da sua estrutura, podendo existir nas formas R ou S (do latim *Rectus* ou *Sinister*, significando direita ou esquerda). Isto resulta na possibilidade de

três formas isoméricas da astaxantina. A forma sintética da astaxantina é produzida como xantofila livre (não esterificada) e como uma mistura dos três isômeros 3*S*,3'*S*, 3*R*,3'*S*, e 3*R*,3'*R* na proporção de 1:2:1 (MERA PHARMACEUTICALS, 2002).

A *trans*-astaxantina é prontamente isomerizada a *cis*-astaxantina, especialmente aos isômeros 9-*cis* e 13-*cis*. Estudos preliminares mostraram que a *trans*-astaxantina não pode ser completamente isomerizada aos seus isômeros do tipo *cis* indicam que a isomerização da *trans*-astaxantina é uma reação reversível (YUAN & CHEN, 2001).

A molécula da astaxantina é bastante similar à do conhecido β -caroteno, mas pequenas diferenças em suas estruturas conferem propriedades químicas e biológicas diferentes às duas substâncias. Apesar de não apresentar atividade como pró-vitamina A, vários estudos têm demonstrado que este carotenóide possui habilidades preventivas contra o câncer e que pode, desta forma, ser utilizada na Medicina (YUAN & CHEN, 2001). A astaxantina, em particular, exibe um poder antioxidante superior ao do β -caroteno conforme vários estudos *in vitro* (MERA PHARMACEUTICALS, 2002).

A astaxantina é um potente antioxidante lipofílico que normalmente exerce suas propriedades antioxidantes em membranas celulares ricas em lipídios, lipoproteínas e outros tecidos. Ainda existe a dúvida se o aumento na eficiência da habilidade seqüestradora está relacionada a esterificação das hidroxilas nas posições 3 e 3' (CARDOUNEL *et al.*, 2003).

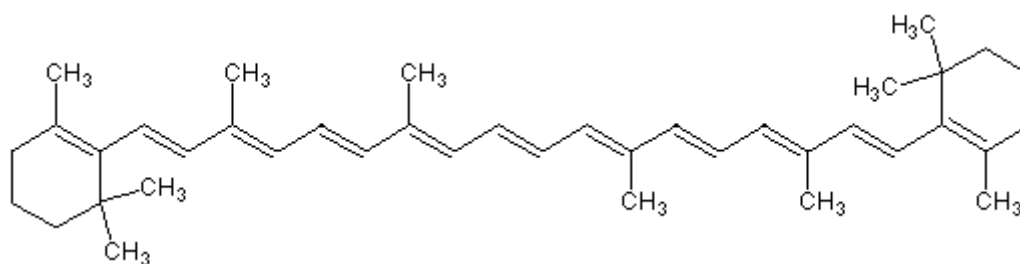
1.2.2 β -Caroteno

As atividades antioxidantes do β -caroteno (figura 13) em várias membranas biológicas e sistemas de modelos de membranas já foram extensivamente estudadas e sabe-se que uma molécula de β -caroteno é capaz de reagir com pelo menos 1000 moléculas de oxigênio singlete sem que ele mesmo seja destruído

(BAST *et al.*, 1998; GOTO *et al.*, 2001).

Em adição ao seu uso como corante, ele também é utilizado como suplemento dietético devido ao seu poder antioxidante. Este carotenóide é aprovado para o uso nos Estados Unidos como aditivo colorante para alimentos, remédios e cosméticos. A JECFA estabeleceu como ingestão diária aceitável um valor de 0 – 5 mg/Kg de peso corporal. O β -caroteno apresentou resultados negativos para os testes de genotoxicidade. A toxicidade oral aguda é baixa – DL_{50} em cães é maior que 800 mg/Kg (HALLAGAN *et al.*, 1995).

FIGURA 13 – ESTRUTURA QUÍMICA DO β -CAROTENO



O uso clínico do β -caroteno como um efetivo tratamento para a protoporfiria eritropoiética, na qual o oxigênio singlete é produzido via sensibilização de porfirinas livres acumuladas na pele, já é bem estabelecido (YOUNG & LOWE, 2001).

1.2.3 Bixina

O urucum – *Bixa orellana* (figura 14) da família *Bixaceae*, é uma pequena árvore nativa da América do Sul e Central que está amplamente distribuída pelos trópicos e que ganhou este nome dos índios. O seu significado – cor vermelha – se justifica pelo seu uso como pintura corporal nesses indivíduos. Sua ampla distribuição geográfica é responsável por seus mais de cinquenta nomes diferentes. É conhecido no Brasil como urucum, urucu, bixa, açafoa; na América espanhola como achioté, anoto, Koesow, Kuxut, achiti; na França como rocouyer, na Alemanha

como orleans-baum e nos países de língua inglesa como annatto (NAKANO, 1991).

FIGURA 14 – FOTOGRAFIA DO URUCUM E SUAS SEMENTES



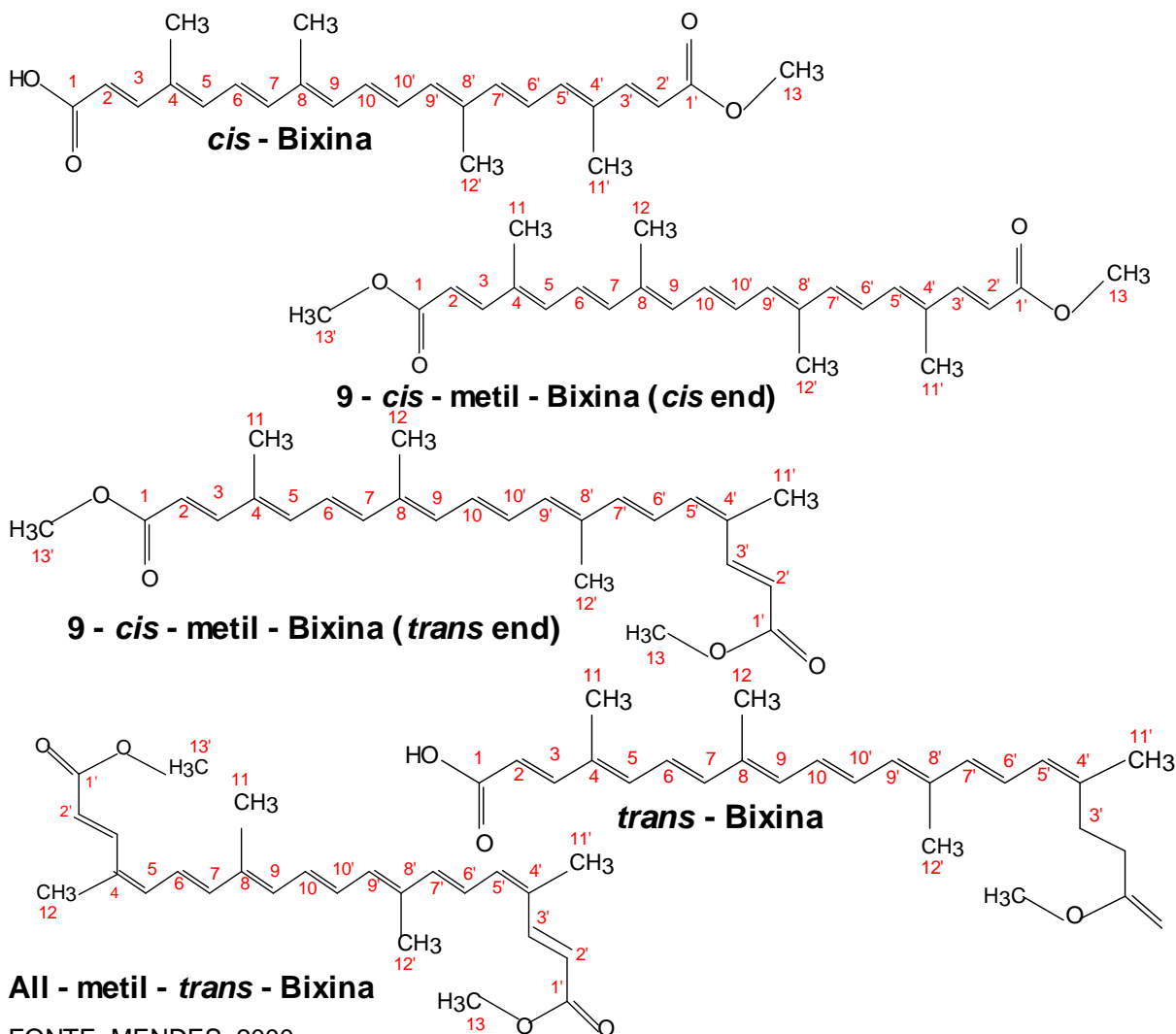
FONTE: FONTANA, J. D. - orientador

O urucum é principalmente utilizado como corante de alimentos. Ele tem sido empregado na Europa e nos Estados Unidos por mais de 100 anos. A bixina, seu principal carotenóide, foi identificado pela primeira vez em 1825 (TJP MARKET DEVELOPMENT, 1998). Os extratos de urucum contêm os carotenóides naturais obtidos do seu pericarpo, ou ainda mais propriamente da testa ou tegumento que envolve a semente (embrião). Os dois maiores componentes destes extratos são: a bixina lipossolúvel (9'-*cis*-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato monometilado, $C_{25}H_{30}O_4$) e a *nor*-bixina hidrossolúvel, o ácido dicarboxílico correspondente ($C_{24}H_{28}O_4$) (HUMEAU *et al.*, 2000).

A bixina (figura 15), como todo carotenóide, é formada por uma cadeia de duplas ligações conjugadas alternadas, que lhe confere algumas características especiais. Além disso, ela pode ser considerada única entre os carotenóides naturais, por causa dos seus dois grupos carboxílicos e por ser um dos poucos

carotenóides do tipo *cis* (SILVA *et al.*, 2001).

FIGURA 15 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS ISÔMEROS DA BIXINA



FONTE: MENDES, 2000.

A bixina, que é um carotenóide com dois grupos ácidos carboxílicos (sendo um deles esterificado com metanol), é o maior pigmento presente nos extratos do urucum (80%) e é o primeiro polieno para qual o estereoisomerismo foi demonstrado. Existe também a *nor*-bixina, que é derivada da bixina pela hidrólise do grupo metil-éster e é hidrossolúvel (LANCASTER *et al.*, 1996; KIOKIAS & GORDON, 2003). Não existem menções na literatura sobre investigação espectroscópica detalhada da bixina, mas está bem estabelecido que ela ocorre na

forma instável *cis* quando na planta, convertendo-se na forma estável *trans* após a extração com solventes orgânicos (OLIVEIRA *et al.*, 1997).

Annatto [C.I. (1956)75120; C.I. Natural orange 4; EEC nº. E 160b] é o nome comum do corante produzido das sementes da árvore tropical *Bixa orellana* L. Durante os últimos cem anos, o annatto tem sido utilizado primeiramente para colorir produtos alimentares ricos em gorduras como manteiga e queijos, mas atualmente é utilizado em uma ampla variedade de produtos como cereais, lanches, cremes para café e sorvetes (LANCASTER & LAWRENCE, 1996). Assim como outros carotenóides, a aplicação industrial de seus pigmentos é restrita devido a sua rápida degradação oxidativa. A perda de cor também ocorre após tempo de exposição prolongado à luz, temperaturas elevadas e na presença de dióxido sulfúrico (SCOOTER *et al.*, 1998; HUMEAU *et al.*, 2000).

Dentre os corantes naturais, o urucum é o mais utilizado pela indústria brasileira, representando cerca de 90% dos corantes naturais usados no Brasil e 70% no mundo. Do total de sementes produzido no Brasil, cerca de 25% são utilizados na preparação de extratos lipo- e hidrossolúveis e o restante é utilizado na fabricação do colorífico (colorau), totalmente consumido no mercado interno. Segundo a resolução CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos) 12/78 do Ministério da Saúde, o colorífico é definido como um produto constituído pela mistura de fubá ou farinha de mandioca com o urucum em pó ou extrato adicionado ou não de sal e de óleos comestíveis. Este produto, quase que exclusivamente de uso doméstico, proporciona cor avermelhada ao arroz, risotos, farofas, molhos e queijos. Seu principal mercado é a região Nordeste do país (TOCCHINI & MERCADANTE, 2001).

A produção total de sementes de urucum no Brasil aumentou de 972 toneladas em 1984 para 7332 toneladas em 1989. O preço médio para as sementes exportadas do Brasil em 1987 foi de US\$ 1,57/kg. A principal produção nacional vem dos estados de São Paulo, Paraíba e Pará (WOLF, 1999). A produção total mundial

estimada é de 10.000 toneladas/ano, tendo como os maiores exportadores o Peru e o Quênia e, como os maiores importadores, os Estados Unidos, Europa e Japão (FAO, 1999).

Em diversas ocasiões, o Ministério da Agricultura de vários países latino-americanos referiram-se ao potencial econômico que representa a exploração industrial do pigmento da *Bixa orellana*, L. A produção do pigmento deixa como resíduo a semente, a qual poderia contribuir para que a exploração do urucum fosse mais rentável. Os resultados de análises químicas da semente do urucum revelaram que esta contém quantidades intermediárias de proteínas (entre 13 e 16%). Os níveis de fibra crua também são relativamente altos (cerca de 16%). A semente também é rica em fósforo, mas pobre em cálcio. Em relação aos aminoácidos, parece conter níveis adequados de triptofano e lisina, mas valores reduzidos de metionina, isoleucina, leucina, fenilalanina e treonina (BRESSANI *et al.*, 1983; WURTZ & TORREBLANCA, 1983).

O uso da bixina (annatto) é aprovado para uso nos Estados Unidos como um aditivo colorante para alimentos, remédios e cosméticos. Vários estudos em relação ao potencial genotóxico da bixina sugerem que este aditivo natural não é nem mutagênico nem clastogênico em células de mamíferos. Nenhum efeito adverso na reprodução foi demonstrado em um estudo onde a alimentação de múltiplas gerações de ratos foi suplementada com este carotenóide (HALLAGAN *et al.*, 1995; PAUMGARTTEN *et al.*, 2002). Em investigações realizadas na Holanda sobre a toxicidade do urucum, mediante experiências em ratos, camundongos e suínos, concluiu-se que o pigmento não apresentou toxicidade, podendo ser empregado com segurança para colorir manteigas, margarinas e queijos. Levando em consideração os dados toxicológicos do extrato de urucum, o JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) estabeleceu uma ingestão diária aceitável para homens de 0 – 0,065 mg/Kg de peso corpóreo (expressa como bixina). A bixina foi reportada como sendo o aditivo colorante natural mais

comumente consumido no Reino Unido, onde o consumo *per capita* diário foi estimado em 0,065 mg/kg de peso corporal com base no componente puro. O uso de corantes alimentares no Reino Unido é controlado por legislação, a qual preconiza as condições sob as quais eles podem ser utilizados. Os extratos de annatto podem ser utilizados, sozinhos ou em combinações, apenas em certos alimentos até níveis máximos especificados (SCOOTER *et al.*, 1998; PAUMGARTTEN *et al.*, 2002; HAGIWARA *et al.*, 2003).

Uma recente avaliação da ingestão de bixina no Brasil, entretanto, estimou que o nível de consumo de grande parte da população (cerca de 14 milhões de pessoas) é aproximadamente 150% maior que a ingestão diária recomendada pela WHO (*World Health Organization*). Esta ingestão elevada de bixina pode ser explicada pelo consumo usual do condimento feito das sementes do urucum (colorau) no Norte e Nordeste do Brasil (PAUMGARTTEN *et al.*, 2002). Uma ingestão diária temporária de 1,25 mg/Kg de massa corporal para extratos de urucum tem sido permitida pela FAO/OMS desde 1970 (FIRACE, 2002).

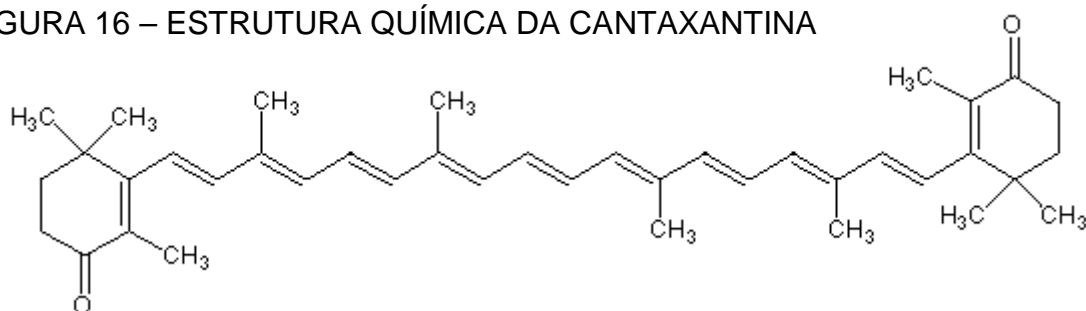
1.2.4 Cantaxantina

A cantaxantina (figura 16) pode ser obtida de forma sintética ou natural. Ela é conhecida principalmente como o pigmento da *Chanterelle* amarelo-alaranjada, mas também ocorre em vários animais inferiores, crustáceos e insetos. Seu nome químico é β - β -caroteno-4,4'-diona ($C_{40}H_{52}O_2$), com peso molecular de 564,86 g/mol (LATSCHA, 1990). Seu uso é aprovado pelo FDA em quantidades que não podem exceder a 30 mg/libra em alimentos sólidos ou semi-sólidos e em alimentos para galinhas em níveis de até 4,41 mg/Kg. O JECFA não foi capaz de emitir uma recomendação de ingestão diária devido à sua associação com deposição de cristais na retina em humanos. Ela não é genotóxica e sua toxicidade oral é baixa – DL_{50} em camundongos é maior do que 10 g/Kg de peso corporal (HALLAGAN *et al.*,

1995).

Já foi observado que misturas de cantaxantina com LDL inibem a formação de macrófagos a partir de monócitos humanos. Entretanto, se a cantaxantina e a LDL forem adicionadas simultaneamente (mas sem mistura prévia) ao meio celular, não se observa nenhum efeito (DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000).

FIGURA 16 – ESTRUTURA QUÍMICA DA CANTAXANTINA

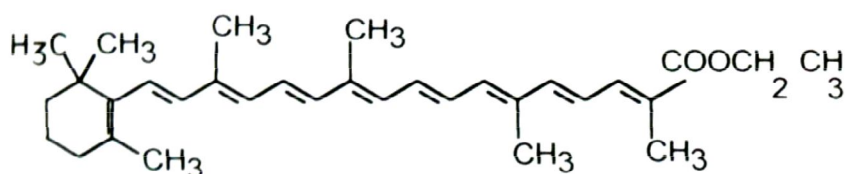


FONTE: o autor

1.2.5 Etil Ester do Ácido Apocarotenóico

O etil éster do ácido apocarotenóico (Carophyll Yellow[®]) representado pela figura 17, é convertido em galinhas em ácido apocarotenóico, um metabólito vastamente distribuído na natureza. Sua fórmula química é $C_{32}H_{44}O_2$ e possui um peso molecular de 460,7 g/mol (LATSCHA, 1990).

FIGURA 17 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ETIL ÉSTER DO ÁCIDO APOCAROTENÓICO



FONTE: LATSCHA, 1990.

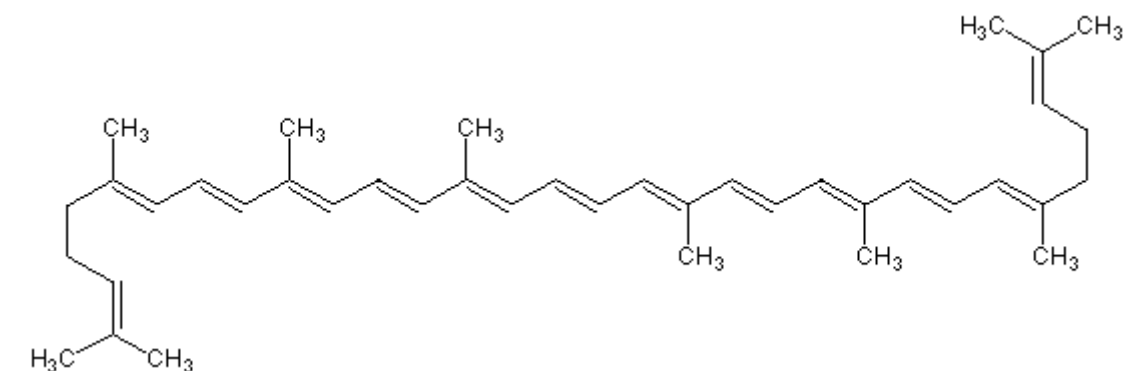
1.2.6 Licopeno

Os tomates (*Solanum lycopersicum*) e seus produtos são a maior fonte de licopeno da dieta humana. O conteúdo de licopeno nos tomates varia com as espécies. Algumas das variedades mais vermelhas contêm até 50 mg/kg, enquanto as variedades mais amarelas possuem cerca de 5 mg/kg. O conteúdo de vários carotenóides, inclusive o licopeno, aumenta com o amadurecimento do fruto (STAHL & SIES, 1996).

O licopeno (figura 18) é um hidrocarboneto acíclico com 11 duplas ligações conjugadas na configuração *trans*, mas que pode ser encontrado na forma *cis* em tecidos e no soro. Já se foi demonstrado que como os níveis de licopeno oriundos da dieta na foram toda *trans* estavam aumentados, a proporção relativa de licopeno na forma *cis* também era aumentada, principalmente o isômero 5-*cis* (COHEN, 2002).

Existe uma clara evidência a partir de estudos epidemiológicos de que a ingestão de 400 – 600 gramas por dia de frutas e vegetais está associada com um risco reduzido de vários tipos de câncer aerodigestivos, de próstata e de mama. O aumento dos níveis séricos do licopeno estão associados com um risco menor de câncer de pulmão, mesmo entre os fumantes (HEBER & LU, 2002). A ingestão diária de licopeno é cerca de 1 mg por dia para humanos. Durante o verão e o outono a ingestão é significativa maior do que no inverno e na primavera. Nos Estados Unidos a consumo *per capita* diário é de 3,7 mg por dia, estando na mesma faixa de consumo do β -caroteno, com cada um desses carotenóides contribuindo para 30% do total de carotenóides da dieta (STAHL & SIES, 1996).

FIGURA 18 – ESTRUTURA QUÍMICA DO LICOPENO



FONTE: o autor

1.3 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DOS CAROTENÓIDES

A modificação química de lipídios é hoje um novo conceito. Já em 1844, PELOUZE e GELIS reportaram a esterificação do glicerol com ácido butírico. Hoje em dia, as estratégias de modificações de lipídios na indústria alimentícia incluem o fracionamento, hidrogenação e interesterificação e outras reações químicas como a acetilação (MARANGONI & ROUSSEAU, 1995). Os dados revisados nesta seção referem-se apenas a acetilação.

1.3.1 Acetilação

A acetilação é um processo onde a substância é esterificada pelo tratamento com anidrido acético e piridina sob aquecimento. Após a reação, o excesso de reagentes pode ser facilmente removido. Todos os grupos hidroxila primários e secundários podem ser acetilados desta forma, exceto aqueles impedidos estericamente (NEHER, 1969; TOTANI & MURAMATSU, 1981).

1.4 MODIFICAÇÕES FÍSICAS DE CAROTENÓIDES

Os dados sobre modificações físicas que estão apresentados nesta seção referem-se apenas às modificações que foram realizadas nesta tese: a complexação

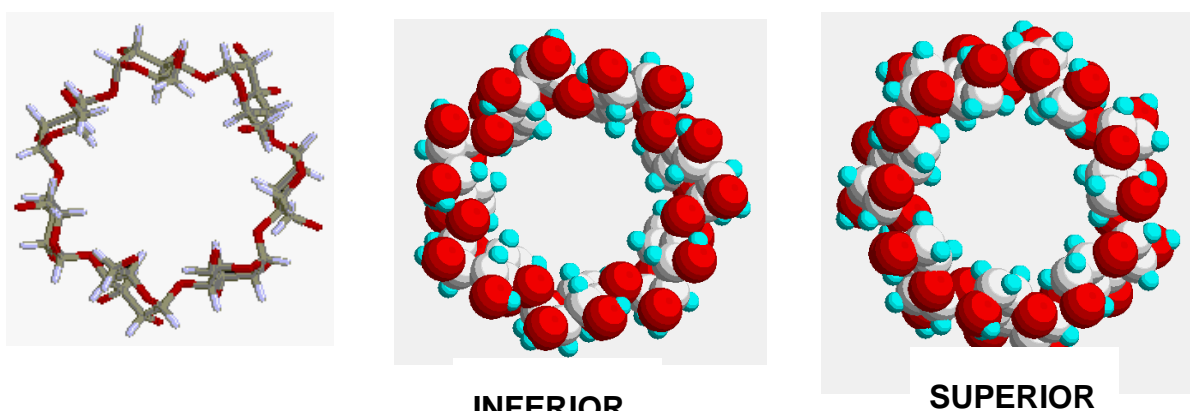
com ciclodextrinas e com quitosana.

1.4.1 Complexação com Ciclodextrinas

1.4.1.1 Estrutura e características físico-químicas das ciclodextrinas

As ciclodextrinas - (dextrinas de Schardinger, cicloamiloses ou cicloglucanas) são oligomaltossacarídeos cíclicos constituídos por um número variável de unidades de glucose (geralmente seis a oito), unidos por ligações do tipo α -(1 \rightarrow 4). As mais comuns são as α -CD, β -CD (figura 19) e γ -CD (constituídas por seis, sete e oito unidades de glucose respectivamente) (BENDER, 1978; SZEJTLI, 1988; MATIOLI, 1997).

FIGURA 19 – ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA β -CD



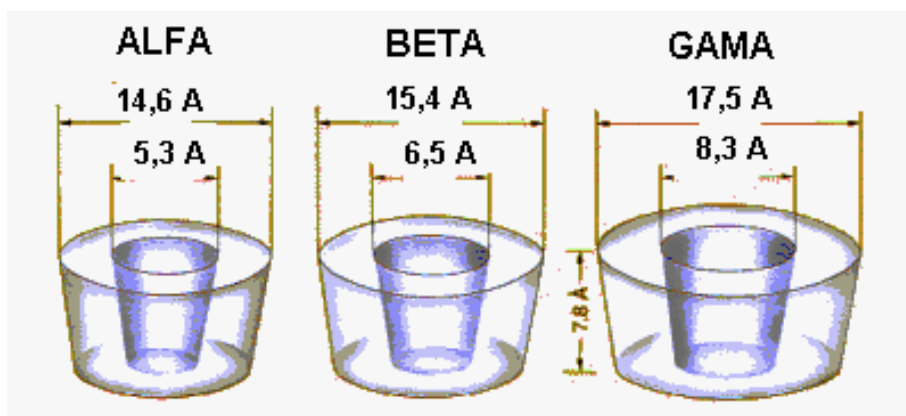
FONTE: MENDES, 2000.

As ciclodextrinas possuem peso molecular entre 972 e 1300. Desta forma elas podem ser consideradas maiores que os compostos orgânicos convencionais, mas são também consideravelmente menores do que enzimas, cujos pesos moleculares estão acima de 12000, no mínimo. Estas estruturas cíclicas possuem algumas características interessantes como: são não-redutoras e, em geral, dão reações positivas em testes característicos de carboidratos não-redutores; a glucose

é o único produto da sua hidrólise ácida e o 2,3,6-trimetilglucose é o único produto de metilação seguida de hidrólise (logo, a ligação entre os resíduos glicosil é do tipo 1→4); os seus pesos moleculares são múltiplos integrais do valor do resíduo de glucose (162,1) e a oxidação por periodato não produz nem ácido fórmico nem formaldeído (BENDER, 1978; SZEJTLI, 1988; MATIOLI, 1997).

As dimensões das ciclodextrinas variam com o número de unidades de glucose. Devido à diferença do diâmetro da cavidade interna (figura 20), cada CD mostra uma capacidade diferente de formação do complexo de inclusão, com diferentes tamanhos de moléculas hóspedes (SZEJTLI, 1988; MATIOLI, 1997).

FIGURA 20 – DIMENSIONAMENTO DA CAVIDADE DAS CICLODEXTRINAS



FONTE: MATIOLI, 1997 – modificada pelo autor.

As ciclodextrinas são produzidas usualmente a partir do amido pela reação de ciclização das cadeias lineares de glucopirranose pela enzima ciclodextrina glicosiltransferase - CGTase (SZEJTLI, 1988; MATIOLI, 1997).

Estudos de ressonância magnética de prótons, espectroscopia de infravermelho e espectroscopia de dispersão de rotação ótica demonstraram que as unidades de D-glucopirranose nas ciclodextrinas estão na conformação de cadeia (em dimetilsulfóxido e D₂O) (BENDER, 1978).

A conformação da ligação C₁ – O₄ – C₄ entre os seis resíduos de glucose

define a conformação macrocíclica das ciclodextrinas. Os parâmetros especificando esta ligação – as duas distâncias de ligação, o ângulo de ligação e os ângulos tensionais para as rotações entre ligações C-O – refletem o tamanho e a natureza da substância incluída e as forças intermoleculares presentes (MANOR, 1974).

Em consequência da conformação do C₁ dos resíduos de α -D-glucopiranosil e da falta de rotação livre ao redor das ligações glicosídicas, as ciclodextrinas não são moléculas perfeitamente cilíndricas, mas apresentam a forma de um tronco de cone. Os grupos hidroxila (OH) secundários (nos átomos de C₂ e C₃ das unidades de glucose) estão situados de um lado do anel e todas as hidroxilas primárias (no átomo de C₆) do outro lado. Isto torna as ciclodextrinas hidrofílicas externamente. O lado das hidroxilas secundárias é mais largo que o lado das hidroxilas primárias. A rotação livre das OH primárias reduz o diâmetro efetivo da cavidade no lado onde elas ocorrem, enquanto o grupo de OH secundárias apresenta uma cadeia relativamente rígida, sem rotação (BENDER, 1978; SZEJTLI, 1988; MATIOLI, 1997).

Enquanto a superfície externa possui natureza hidrofílica, os pares de elétrons livres dos oxigênios envolvidos em ligações glicosídicas são dirigidos para o interior da cavidade, proporcionando uma elevada densidade eletrônica e, por consequência, um caráter apolar. Graças à natureza hidrofóbica da cavidade, moléculas de tamanho, forma e hidrofobicidade adequadas são capazes de interagir de forma não covalente, para formar um complexo estável, por inclusão molecular (BENDER, 1978; SZEJTLI, 1988; MATIOLI, 1997).

A solubilidade das ciclodextrinas aumenta rapidamente com a elevação da temperatura, o que permite uma recristalização fácil quando do abaixamento da temperatura. A solubilidade em diferentes solventes orgânicos pode igualmente variar com a temperatura. As ciclodextrinas possuem 18, 21 e 24 grupos OH (α -, β - e γ -CD respectivamente), os quais podem ser modificados quimicamente. Os grupos C₆-OH são os mais reativos, e os grupos C₃-OH os menos. A diferença de reatividade não é muito alta, mas depende das condições da reação (temperatura,

alcalinidade). Por estarem orientadas para fora, as OH dos átomos C₂, C₃ e C₆ podem sofrer ataque químico que modifica a estrutura das ciclodextrinas sem alterar a cavidade central. Isto permite que as ciclodextrinas sejam transformadas em derivados tipicamente orientados, com modificações em suas propriedades físico-químicas (BENDER, 1978; SZEJTLI, 1988; MATIOLI, 1997).

Em soluções aquosas as cavidades da CD não são espaços vazios. O volume das cavidades presente em um grama de α -CD é cerca de 0,1 ml. Para manter todo este espaço vazio seriam necessários 65 Kcal/mol; as ciclodextrinas de diâmetro maior precisariam de mais energia ainda. Além disso, se as cavidades permanecessem vazias, os volumes específicos parciais das ciclodextrinas em solução seriam maiores do que os da glucose ou da maltose, o que não acontece. A disposição das moléculas de CD em arranjo cristalino pode ser de dois tipos: as moléculas podem arranjar-se formando uma estrutura em gaiola ou em canal. Nas estruturas em gaiola, a cavidade de cada CD é bloqueada dos dois lados pelas moléculas adjacentes de CD, isolando assim cada uma das cavidades. Nesse tipo de arranjo cristalino, as ciclodextrinas podem estar dispostas em padrões com forma de cruz, bloco ou espinha de peixe. Nas estruturas em canal, as moléculas se alinham uma sobre as outras, como uma pilha de moedas. As moléculas inclusas ficam contidas dentro de canais infinitos formados pelo alinhamento linear das cavidades. Esses alinhamentos podem ser do tipo “cabeça-cabeça” ou “cabeça-cauda” (SZEJTLI, 1988; MATIOLI, 1997).

As ciclodextrinas têm sabor doce. Uma solução de 2,5% de β -CD é tão doce quanto uma solução de 1,7% de sacarose. Portanto, quando a β -CD for utilizada no processamento de alimentos seu poder adoçante não poderá ser menosprezado. Além disso, as ciclodextrinas não têm ponto de fusão definido, mas começam a se decompor a partir de 200°C. Suas propriedades térmicas exatas dependem do teor de água, da estrutura cristalina, do grau de aquecimento e também da composição da atmosfera. As viscosidades das soluções de ciclodextrinas aquosas não diferem

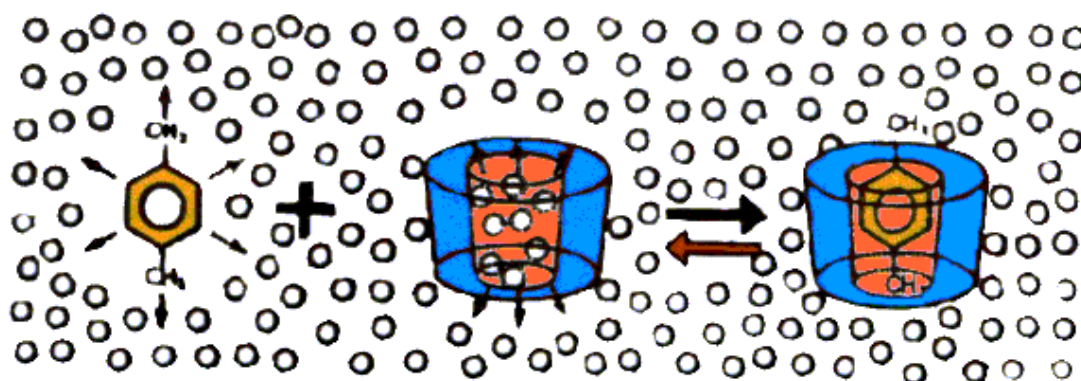
significativamente da viscosidade da água (SZEJTLI, 1988; MATIOLI, 1997).

1.4.1.2 Formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas

Talvez a característica mais extraordinária das ciclodextrinas é a habilidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de compostos, isto é, aprisionar várias moléculas externas (hóspedes) dentro da cavidade de uma ciclodextrina (molécula hospedeira). A necessidade mínima para a formação deste complexo de inclusão é que a molécula hóspede deve-se adequar inteiramente, ou ao menos parcialmente, dentro da cavidade da CD. Complexos estáveis não serão formados com moléculas hóspedes pequenas para serem envolvidas por moléculas de ciclodextrinas, porque estas escaparão do seu interior. Também é impossível a formação de complexos de inclusão com moléculas que não possam penetrar na cavidade da CD, mas se certos grupos ou cadeias laterais da molécula volumosa conseguirem se acomodar na cavidade da CD, a formação do complexo se torna possível (SZEJTLI, 1988; MATIOLI, 1997).

Usualmente são formados os complexos 1:1 (CD:hóspede), mas quando uma molécula hóspede é muito longa para se acomodar em uma cavidade, a sua outra extremidade também é responsável pela formação do complexo, e assim podem ser formados os complexos 2:1, 2:2, 3:1, entre outros (figura 21). Contudo, também é possível formar o complexo 1:2. Não somente a estequiometria, mas também a polaridade de determinadas moléculas hóspedes determina se a inclusão pode ocorrer. Apenas moléculas que são menos polares que a água podem formar complexos de inclusão com CD. Em geral, moléculas hidrofóbicas ou alguns resíduos hidrofóbicos tem a mais alta afinidade pela cavidade da CD em solução aquosa. A hidratação de um complexo de CD com um hóspede hidrofóbico é favorecida energeticamente, comparada com a hidratação separada dos componentes (SZEJTLI, 1988; MATIOLI, 1997).

FIGURA 21 – FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM CICLODEXTRINA



FONTE: MATIOLI, 1997 – modificada pelo autor.

Se uma molécula hóspede é muito grande para penetrar na cavidade da CD por inteiro, uma porção da molécula – chamada de sítio de ligação – pode entrar nesta cavidade. Por exemplo, uma molécula de benzeno 1,4-dissubstituída ($X-C_6H_4-Y$) é muito volumosa para ser completamente incluída dentro da cavidade da α -CD, mas esta molécula possui dois sítios de ligação (X e Y), cada um incluindo alguma porção do anel vizinho que pode adentrar a cavidade em complexos 1:1 isoméricos (GADRE, 1997).

Compostos muito pouco solúveis não podem ser complexados em nenhuma concentração aceitável sem o uso de solventes. No entanto, já foi demonstrado que a adição de outros componentes selecionados como álcool e surfactantes pode afetar a formação destes complexos de inclusão (YOSHII, 1998).

Na ausência da molécula hóspede, a cavidade hidrofóbica que atua como hospedeira, é ocupada por moléculas de água. Contudo, uma molécula hóspede específica, quando adicionada da solução de CD, expulsa as moléculas de água e ocupa ela própria esta cavidade. As moléculas incluídas estão normalmente orientadas em posição tal, que permite o máximo contato entre a parte hidrofóbica da molécula hóspede e cavidade apolar da CD. A parte hidrofílica do hóspede permanece, tanto quanto possível, na face externa do complexo. Isto assegura o

máximo de contato entre o solvente e os grupos OH da molécula hóspede. As forças coesivas que existem entre as duas partes do complexo são tão grandes que impedem a sua separação, o que é uma pré-condição para a inclusão (SZEJTLI, 1988).

O mecanismo de formação destes complexos de inclusão pode ser dividido em vários passos: 1) a aproximação da molécula hóspede à molécula de CD; 2) quebra da estrutura de água dentro da cavidade da CD e remoção de algumas moléculas de água do exterior da CD; 3) quebra da estrutura aquosa ao redor de parte da molécula hóspede que vai ser incluída na CD e transporte de algumas moléculas de água pela solução; 4) interação de grupos químicos da molécula hóspede com a CD; 5) formação de pontes de hidrogênio e outras forças hidrofóbicas entre as moléculas e 6) reconstituição da estrutura aquosa ao redor das partes expostas da molécula hóspede e da CD. Nos passos 1, 4 e 5 estão envolvidos fatores estéricos que podem comprometer a estabilidade e/ou a taxa de formação do complexo (CRAMER, 1967).

A inclusão de uma molécula hóspede na cavidade da CD é inibida pela adição de uma segunda molécula hóspede, sendo a extensão desta inibição dependente da constante de estabilidade de cada complexo. Esta competição é um fato característico dos complexos de inclusão envolvendo CD e éteres coroniformes (MIYAKE, 1999).

1.4.1.3 Metabolismo e toxicidade das ciclodextrinas

Quando as ciclodextrinas ou complexos de inclusão são oralmente administrados, a absorção da CD livre merece atenção, porque os complexos de inclusão se dissociam dentro de condições fisiológicas. As ciclodextrinas administradas oralmente têm mostrado serem pouco danosas, provavelmente porque quantidades insignificantes de ciclodextrinas são absorvidas a partir do trato

gastrointestinal. A absorção da molécula hóspede e da CD são processos diferentes. A absorção do hóspede hidrofóbico é largamente acelerada, enquanto apenas quantidades insignificantes de ciclodextrinas são absorvidas intactas. A CD age como um verdadeiro carreador, trazendo o hóspede para a solução e mantendo-o em estado dissolvido para transportá-lo até a membrana celular lipofílica. Após entregar a molécula hóspede à membrana, a CD permanece na fase aquosa (devido à maior afinidade do hóspede pela membrana). A CD é então metabolizada pela flora intestinal (cólon) e os seus metabólitos primários (maltodextrina, maltose e glucose) vão ser absorvidos e, finalmente, excretados como CO₂ e água. Testes para determinar a toxicidade aguda das ciclodextrinas naturais administradas oralmente em ratos resultaram em altos valores de DL₅₀ > 10 g/kg (SZEJTLI, 1988; MATIOLI, 1997).

As ligações glicosídicas das ciclodextrinas são clivadas por certas enzimas degradadoras de amido com a mesma especificidade do substrato, apesar da reação ser bem mais lenta que em açúcares lineares. As ciclodextrinas são hidrolisadas pela α -amilase, que rompe as ligações glicosídicas do tipo endo α -(1→4), enquanto elas não são hidrolisadas por glucoamilases que clivam ligações glicosídicas α -(1→4) de glucoses terminais não-redutoras e pululanases, que quebram as ligações glicosídicas do tipo α -(1→6). As α -amilases humanas salivares e pancreáticas são capazes de hidrolisar as ciclodextrinas, com sua reatividade aumentando na seguinte ordem: α -CD < β -CD << γ -CD. Além disso, muitas bactérias isoladas do cólon intestinal humano são capazes de degradar as ciclodextrinas, como evidenciado pela sua habilidade de crescer em meios que utilizam as ciclodextrinas como única fonte de carbono. Esta propriedade das ciclodextrinas pode ser particularmente útil na absorção sítio-específica de drogas ao cólon. Isto pode ser comprovado em um experimento onde um antiinflamatório foi complexado com uma CD e a droga foi liberada preferencialmente nas incubações com partes do cólon, enquanto nenhuma liberação apreciável foi observada nas incubações com

partes de intestino ou estômago, em homogenatos intestinais ou hepáticos e nem no sangue de ratos (IRIE, 1997).

As ciclodextrinas administradas intravenosamente desaparecem rapidamente da circulação sistêmica e são excretadas principalmente pelo fígado. Apesar da α - e β -ciclodextrinas serem excretadas quase que completamente intactas pela urina, a γ -CD é degradada em uma considerável extensão em ratos (IRIE, 1997).

A viabilidade comercial de formulações orais baseadas nas ciclodextrinas já foi estabelecida no mercado de produtos da Europa e Japão. É geralmente reconhecido que a absorção gastrointestinal da CD na forma intacta é limitada devido à sua natureza volumosa e hidrofílica. As ciclodextrinas atuam como carreadores de drogas que levam a substância através de um meio aquoso até o local de absorção e permanecem no trato gastrointestinal. O destino das ciclodextrinas no trato gastrointestinal é diferenciado, baseado na resistência à hidrólise e degradação enzimática. A α - e β -ciclodextrinas são praticamente resistentes aos ácidos estomacais e às amilases salivares e pancreáticas, mas são extensivamente hidrolisadas pelas bactérias do cólon. Já a γ -CD é muito pouco digerida, mesmo no intestino superior. Os metabólitos primários, presumivelmente maltodextrinas acíclicas são posteriormente metabolizadas, absorvidas e finalmente excretadas como CO_2 e H_2O (IRIE, 1997).

As ciclodextrinas também têm sido aplicadas para otimizar a absorção transdermal de drogas tanto para uso local ou sistêmico. Em geral, as ciclodextrinas e seus complexos parecem ser absorvidos através da pele apenas com considerável dificuldade, isto é, apenas a fração livre da droga que está em equilíbrio com a parte complexada poderá estar disponível para a absorção percutânea (IRIE, 1997).

Todos os estudos de toxicidade têm demonstrado que quando administradas oralmente as ciclodextrinas são praticamente não-tóxicas, porque não são absorvidas pelo trato gastrointestinal. Não foram observadas taxas de mortalidade mesmo em animais recebendo a mais alta dose possível de ciclodextrinas. Por

exemplo, os valores de DL_{50} para a β -CD são reportados como sendo maiores que 12,5, 18,8 e 5 g/kg para camundongos, ratos e cachorros, respectivamente. Nenhum efeito tóxico foi observado em ratos alimentados com uma dieta contendo 10% de β -CD por 90 dias (IRIE, 1997).

1.4.2 Complexação com Quitosana

1.4.2.1 Estrutura e características físico-químicas da quitosana

A quitosana (figura 22) é um mucopolissacarídeo naturalmente abundante e que constitui o material de suporte de crustáceos, insetos e outros organismos. É um biopolímero poli-catiônico obtido através da N-desacetilação da quitina, que pode ser degradada por enzimas denominadas quitinases (CUROTTO & AROS, 1993; CHANG *et al.*, 1997; KUMAR, 2000).

A quitina (figura 22), por sua vez, é um polissacarídeo descoberto há quase dois séculos (em 1811) por FRENCHMANN BRACONNOT como uma substância presente nos cogumelos. A quitina é vastamente distribuída, especialmente em animais, mas também existe em grupos taxonômicos menos desenvolvidos, como os protozoários. As estruturas quitinosas são encontradas principalmente em animais multicelulares e formam o exoesqueleto da maioria dos invertebrados. A fonte tradicional e comercial de quitina é obtida de cascas de caranguejos, camarões e “krill”, que são descartes do processamento de produtos alimentares de origem marinha (KUMAR, 2000; OKUYAMA *et al.*, 2000; KHOR, 2001; CAMPANA-FLIHO *et al.*, 2002; SYNOWIECKI & AL-KHATEEB, 2003; THARANATHAN & KITTUR, 2003).

A quitina é a maior fonte de biomassa sub-explorada na terra. Todo ano cerca de 100 bilhões de toneladas de quitina são produzidas por crustáceos, moluscos, insetos e fungos pela indústria nos Estados Unidos e no Japão e nas frotas pesqueiras na Antártida. Vários países possuem grandes fontes de crustáceos

inexploradas, como por exemplo, a Noruega, México e Chile. Entretanto, estes valores podem ser limitados e estão sujeitos à variação sazonal. Em tempos recentes, a quitina obtida pela extração de micélios de fungos está ganhando importância. Estes fungos podem ser cultivados durante o ano todo por processos fermentativos similares aos utilizados na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, *Mucor rouxii* e *Streptomyces*, os quais envolvem um pré-tratamento alcalino drástico (OTTØY *et al.*, 1996; KUMAR, 2000; KHOR, 2001; TENG *et al.*, 2001; SYNOWIECKI & AL-KHATEEB, 2003; THARANATHAN & KITTUR, 2003). No Brasil, os estados do Ceará e de Santa Catarina, pesqueiros tradicionais fornecem a matéria prima para as indústrias locais de quitosana.

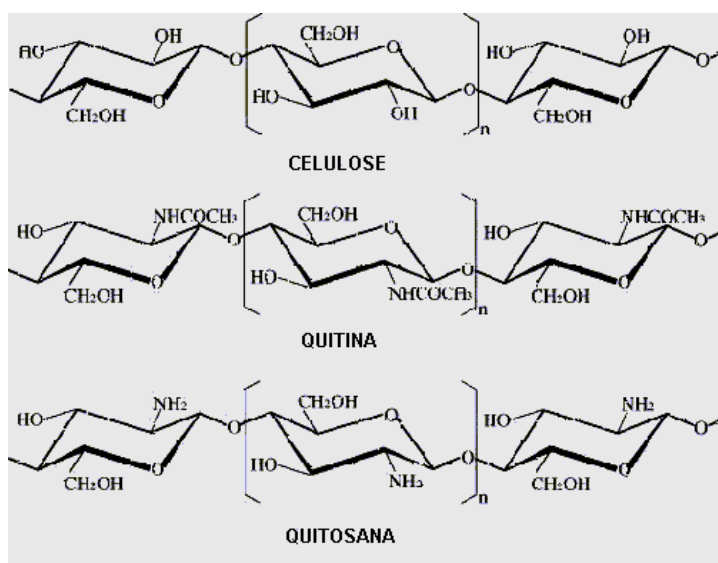
A produção de quitosana obtida como descarte da indústria de alimentos é economicamente viável especialmente se for levada em consideração a recuperação dos componentes carotenóides. As cascas de crustáceos contêm quantidades consideráveis de astaxantina e que é comercializado como aditivo na alimentação de pescados, especialmente o salmão (KUMAR, 2000). As outras vias são a de síntese química (caso da Hoffmann-La Roche com o produto Carophyll Pink) e cultivo da levedura *X. dendrohos* (antes *Phaffia rhodozyma*) em caldo de cana suplementado com uréia (FONTANA *et al.*, 1996).

A quitina é um polissacarídeo catiônico, nitrogenado, branco e inelástico. É um material altamente insolúvel, lembrando a celulose em sua solubilidade e baixa reatividade química. Como tal, ela funciona naturalmente como um polissacarídeo estrutural (KUMAR, 2000; THARANATHAN & KITTUR, 2003).

A maior parte dos polissacarídeos naturalmente encontrados como a celulose, dextranas, pectina, agar, agarose e carragenanas são neutros ou ácidos na natureza, enquanto a quitina e o quitosana são exemplos de polissacarídeos básicos. A quitina e a quitosana também são conhecidas por exibir polimorfismo (figura 22). Geralmente, as cadeias individuais assumem uma estrutura linear, a qual passa por uma total torção a cada 10,1 a 10,5 Å ao longo do eixo da cadeia. Pelo

fato de cada unidade glicosídica ser quiral, e de que todas as unidades estão ligadas por um átomo de oxigênio que une o C₁ de uma unidade glicosídica ao C₄ de uma unidade adjacente, cada cadeia do polímero pode apresentar uma direção distinta (direita ou esquerda). O polimorfismo mais comum exibido pela quitina é conhecido como α -conformação, onde cada unidade é ortorrômbica e as cadeias individuais estão arranjadas de uma forma anti-paralela. Assim, as cadeias adjacentes estão orientadas em direções opostas. Um alomorfismo menos comum é a β -conformação, que corresponde a uma unidade celular monoclínica com as cadeias poliméricas arranjadas de forma paralela (KUMAR, 2000; THARANATHAN & KITTUR, 2003).

FIGURA 22 - ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITINA, QUITOSANA E DA CELULOSE



FONTE: OKUYAMA *et al.*, 2000 – modificada pelo autor.

A quitina é estruturalmente similar à celulose, só que possui grupos acetamida nas posições C₂. Ela é conhecida por consistir em monômeros de 2-acetoamido-2 deoxi- β -D-glucose unidos por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4). Das três formas cristalinas de quitina, α -, β - e γ -quitina, a α -quitina é a estudada mais extensivamente por causa da sua abundância e acessibilidade. A quitosana é quase que exclusivamente preparada da α -quitina. Apesar de pouca atenção ter sido dada às outras formas de quitina, elas podem ser uma fonte alternativa promissora com

características distintas. A β -quitina é caracterizada por forças intermoleculares fracas e exibe alta reatividade em várias reações de modificação bem como maior afinidade por solventes que a α -quitina (KURITA, 1998; SHIMOJOH *et al.*, 1998; KUMAR, 2000).

Como a celulose, a quitina funciona naturalmente como um polissacarídeo estrutural, mas difere da celulose em suas propriedades. A quitina é altamente hidrofóbica e é insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. O conteúdo de nitrogênio da quitina varia de 5 a 8% dependendo da extensão da desacetilação, enquanto que o nitrogênio no quitosana é, maiormente, encontrado na forma de grupos amino alifáticos primários. O quitosana, sendo assim, sofre reações típicas de aminas, dentre as quais a N-acetilação e a reação de Schiff são as mais importantes (KUMAR, 2000).

Como a maioria dos polímeros nos dias atuais é composta de materiais sintéticos, sua biocompatibilidade e biodegradabilidade são muito mais limitadas que aquela de polímeros naturais como a celulose, quitina, quitosana e seus derivados. Entretanto, esses materiais naturalmente abundantes também exibem uma limitação na sua reatividade e processabilidade (KUMAR, 2000).

A quitina pode ser convertida em quitosana pela desacetilação alcalina homogênea ou heterogênea, ou por desacetilação enzimática. O processamento a partir de casca de camarão envolve principalmente a remoção das proteínas e a dissolução do carbonato de cálcio, que está presente em altas concentrações. O tratamento com álcali degrada as proteínas e simultaneamente promove a desacetilação da quitina (figura 23).

FIGURA 23 - ESQUEMA DE FORMAÇÃO DA QUITOSANA



FONTE: FRANCE-CHITINE, 2004 – modificado pelo autor.

Dependendo da concentração do álcali, algumas glucanas solúveis são removidas. O tratamento convencional é feito com NaOH 40% a 120°C por 1 a 3 horas, promovendo uma desacetilação de 70% (OTTØY *et al.*, 1996; KUMAR, 2000; CAMPANA-FLIHO *et al.*, 2002; TENG *et al.*, 2001).

A concentração do álcali, o tempo e a temperatura do processo devem ser estritamente controlados, porque influenciam no grau de desacetilação e peso molecular, assim como na distribuição das unidades desacetiladas ao longo da cadeia do polissacarídeo. Essas propriedades refletem o uso da quitosana para várias aplicações, especialmente na indústria farmacêutica. O preparo da quitosana em concentrações amenas de hidróxido de sódio, temperatura relativamente baixa e tempo de desacetilação prolongado causa uma distribuição randomizada dos resíduos desacetilados na molécula da quitosana e em consequência diminui a

habilidade de formar agregados e outras estruturas. A alta temperatura aumenta o grau de desacetilação, mas também reduz o tamanho das moléculas (SYNOWIECKI & AL-KHATEEB, 2003).

A quitina presente no exoesqueleto de camarões está intimamente associada com proteínas. Assim sendo, a desproteínização no processo de extração da quitina é um passo crucial. Um método potencialmente barato seria a utilização de enzimas proteolíticas presentes em certas cepas e simultaneamente utilizar as proteínas do hidrolisado para o cultivo do fungo (TENG *et al.*, 2001; THARANATHAN & KITTUR, 2003).

Apesar das estruturas da quitina e da quitosana serem muito similares, as reações químicas que elas podem realizar são surpreendentemente diferentes. Os dois polímeros possuem grupos hidroxila reativos e grupos amino, mas a quitosana é usualmente menos cristalina que a quitina, o que presumivelmente torna a quitosana mais acessível a reagentes. Provavelmente, a diferença mais marcante entre a quitina e a quitosana está na sua solubilidade. Existem relativamente poucos solventes para a quitina, enquanto quase todas as soluções aquosas são capazes de dissolver a quitosana, das quais as mais comuns são o ácido fórmico e o ácido acético (THARANATHAN & KITTUR, 2003).

Um importante parâmetro a ser examinado mais cuidadosamente é o grau de N-desacetilação da quitina, isto é, a razão entre unidades estruturais de 2-acetoamido-2-desoxi-D-glucopiranoose e 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranoose. Esta proporção tem um efeito bastante sensível na solubilidade da quitina e de suas preparações. Na quitina, prevalecem as unidades acetiladas (grau de acetilação típico de 0,90). O quitosana é o derivado parcial ou totalmente N-desacetilado da quitina, com um grau de acetilação típico menor que 0,35. Para se definir esta relação, estudos devem ser realizados com várias ferramentas analíticas (KUMAR, 2000).

O grau de N-desacetilação tem influência não só sobre as características

físico-químicas do quitosana, mas também na sua atividade biológica. Conseqüentemente, a determinação precisa do grau de N-desacetilação (porcentagem de grupos amino livre) tem sido um campo de muita pesquisa. (CUROTTO & AROS, 1993; CHANG *et al.*, 1997). Novos procedimentos analíticos baseados em métodos enzimáticos, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), titulação condutimétrica e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênios (^1H -RMN), espectroscopia de infravermelho (IR) e outros instrumentos estão sendo continuamente propostos. Além disso, novas técnicas de desacetilação como a lavagem com água intermitente, o uso de solventes orgânicos miscíveis em água, líquidos dispersos orgânicos, alta temperatura ou N-desacetilação enzimática tem sido reportados. De qualquer forma, a cinética da N-desacetilação é de fundamental importância na aplicação de todos os métodos novos (CHANG *et al.*, 1997).

Um ponto central no debate acerca da estrutura do quitosana é se a variação no grau de acetilação causa ou não alguma modificação na cadeia do polímero ou na tendência a agregar. Dois efeitos devem ser considerados: por um lado, um alto conteúdo de grupos acetil pode aumentar a rigidez da cadeia por razões estéricas. De outro lado, um grau de acetilação baixo significa automaticamente uma quantidade maior de grupos amino. Em soluções ácidas, este último pode ligar prótons de tal forma que, finalmente forma-se um polycation altamente carregado. Já é conhecido que, em casos de polímeros com cadeias flexíveis, o acúmulo de cargas leva a uma expansão considerável devida à repulsão eletrostática. Este efeito é mais importante em forças iônicas muito baixas. Em forças iônicas altas, a repulsão é grandemente suprimida devido ao efeito compactador do sal adicionado. Então a contribuição eletrostática a rigidez da cadeia torna-se pequena. Por esta razão, uma força iônica alta é desejada para a caracterização de polieletrólitos em termos de parâmetros moleculares (BERTH *et al.*, 1998).

Para produzir 1 Kg de quitosana 70% desacetilado são necessários 6,3 Kg de

HCl e 1,8 Kg de NaOH, em adição aos requerimentos de nitrogênio, água (0,5 ton) e água resfriada (0,9 ton). Outro item importante para estimar o custo de produção é o transporte, cujas despesas variam dependendo do porto e da localização. A quitina e a quitosana são atualmente produzidos em escalas comerciais na Índia, Japão, Polônia, Noruega e Austrália e Brasil. O preço mundial do quitosana em pequenas quantidades é de US\$ 7,5/10 g (KUMAR, 2000).

Tanto a quitina quanto a quitosana são de interesse comercial devido ao seu alto percentual de nitrogênio (6,89%), comparado à celulose sinteticamente substituída (1,25%). Isto faz da quitina um ótimo agente quelante. Na indústria cosmética, a quitina e o quitosana são utilizados devido à suas características fungicidas. O quitosana é a única goma catiônica natural que se torna viscosa quando neutralizada com ácidos. Esse material é utilizado em cremes, loções e vários derivados. O quitosana possui todas as características requeridas para fazer lentes de contato ideais: claridade ótica, estabilidade mecânica, correção ótica suficiente, permeabilidade gasosa e compatibilidade imunológica (KUMAR, 2000).

1.4.2.2 Formação de complexos com a quitosana

Tanto a quitina quanto a quitosana são capazes de formar complexos com vários metais de transição. Os complexos formados pelos polímeros e metais pesados envolvem a doação de um par de elétrons não ligantes do nitrogênio e/ ou do oxigênio dos grupos hidroxila para o metal pesado. A taxa de formação e a estabilidade dos complexos são extremamente dependentes da temperatura, pH, cristalinidade e grau de N-desacetilação (THARANATHAN & KITTUR, 2003).

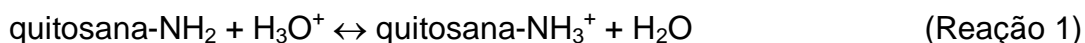
A quitosana, como um polissacarídeo policatiônico, forma géis com íons opostos multivalentes. A interação iônica entre os grupos amino positivamente carregados e estes íons opostos negativamente carregados pode ser utilizada para a formação de esférulas de quitosana (BODMEIER *et al.*, 1989; VACHOUD *et al.*,

2001).

Dois tipos clássicos de hidrogéis podem ser obtidos com a quitina e a quitosana: químicos e físicos. Os géis químicos são formados essencialmente por ligações covalentes. Neste caso, eles são sempre processados, graças ao uso do glutaraldeído ou da epícloridrina. A formação de géis por meio físico é relatada na presença de interações de menor ou maior energia, ou mais ou menos reversíveis que podem ser formadas com pequenos diácidos (ácido oxálico), com poli-oxi-ânions (óxidos de molibdato) ou por modificação química da quitosana. Os géis do tipo físico exibem duas vantagens quando comparados com os químicos. A primeira corresponde à possível reversibilidade nos solventes de quitina, e a segunda é que a estrutura química da cadeia do polímero é preservada. Conseqüentemente, as propriedades físico-químicas e a bioatividade destes compostos são mantidas (VACHOUD *et al.*, 2000).

Através da imersão da quitosana hidratada em solução aquosa de sais metálicos, soluções ácidas orgânicas ou inorgânicas, complexos com os compostos correspondentes podem ser facilmente preparados (OKUYAMA *et al.*, 2000; CANELLA & GARCIA, 2001).

Quando a quitosana é colocada em meio ácido, torna-se um polieletrólito devido à protonação dos grupos NH_2 . A reação de equilíbrio desta transformação pode ser representada pela reação 1, que descreve o estado de ionização (RINAUDO *et al.*, 1999).



1.4.2.3 Metabolismo e toxicidade da quitosana

As quitosanas são de particular interesse na área de alimentos. Eles são os

únicos polissacarídeos aminados abundantes e sua característica catiônica tem atraído muito interesse. Suas ações benéficas ao organismo humano já são bem documentadas e a basicidade conferida pelos grupos amino é o fator chave para o significado biológico desta fibra dietética (MUZZARELLI, 1996).

Esses polímeros já foram identificados como biocompatíveis, não-antigênicos, não-tóxicos e biofuncionais. Em testes realizados em camundongos sobre a toxicidade sistêmica aguda da quitosana não foi observado nenhum efeito da quitosana; todos os animais que tiveram a substância teste injetada viveram durante todo o período de observação (72 horas). Testes de irritação dos olhos em coelhos e irritação de pele em porcos também não revelaram nenhum efeito tóxico da quitosana (KAMIL *et al.*, 2000).

Múltiplas ações da quitina e da quitosana em alimentos estão associadas aos seus efeitos como fibras dietéticas e como um alimento funcional. O FDA já aprovou a quitosana como um aditivo alimentar. Também é utilizada por diminuir os valores séricos de colesterol e triglicerídeos, o que é atribuído ao transporte reverso do colesterol aumentado em resposta às perdas intestinais das gorduras dietéticas. Devido a sua habilidade de formar ligações iônicas em valores de pH baixos, a quitosana pode-se ligar, *in vitro*, a diferentes tipos de ânions, como os sais biliares ou ácidos graxos livres. A quitosana liga-se a ácidos graxos livres para formar os sais correspondentes. Esta ligação é principalmente de natureza iônica; de fato o sal é preparado pela neutralização da quitosana com ácidos graxos como o oléico, linoléico, palmítico, esteárico e linolênico. Grandes proporções destas substâncias aniônicas escapam da hidrólise pelas lipases, promovendo a excreção de material lipídico, incluindo colesterol, esteróis e triglicerídeos. Uma vez no trato digestivo, a quitosana forma micelas com o colesterol, tanto o endógeno quanto o de fonte dietética, na presença dos fluidos alcalinos da parte superior do intestino, resultando em uma diminuição na absorção do colesterol e na circulação do ácido cólico no fígado. Devido à diminuição do ácido cólico, sua síntese através do colesterol no

fígado tende a diminuir a concentração sanguínea do colesterol. No estômago, a quitosana é solubilizada para formar uma emulsão com partículas lipídicas intragástricas, as quais posteriormente precipitam em valores de pH entre 6 e 6,5 no intestino delgado. Com a agregação das cadeias poliméricas, as partículas lipídicas são incorporadas, passando pelo lúmen e sendo excretadas com as fezes (MUZZARELLI, 1996; OKAMOTO *et al.*, 2001; THARANATHAN & KITTUR, 2003).

Recentemente a atividade antioxidante do quitosana e de seus derivados tem chamado a atenção de muitos investigadores. Em um estudo publicado recentemente, foi demonstrada a atividade de derivados de quitosana contra o radical livre hidroxila (OH^\bullet). O mecanismo de seqüestro do radical hidroxila pode estar relacionado com o fato de que a hidroxila pode reagir com átomos de hidrogênio ativos no quitosana para formar uma macromolécula radical mais estável. A taxa de seqüestro destes radicais aumenta com a concentração da quitosana. A atividade do quitosana contra este tipo de radical pode ser explicada por algumas hipóteses como: os grupos hidroxila na unidade do polissacarídeo reagem com o radical hidroxila por uma reação de abstração de hidrogênio típica; as hidroxilas podem reagir com grupos amino livres (NH_2) para formar macromoléculas radicais ou os grupos NH_2 podem formar grupos NH_3^+ por absorver prótons da solução, reagindo então com a hidroxila através de reações de adição (XIE *et al.*, 2001).

1.5 MODIFICAÇÕES ENZIMÁTICAS DE CAROTENÓIDES

A utilização de enzimas isoladas na transformação de compostos orgânicos é conhecida há mais de 100 anos. Entretanto, foi somente a partir da segunda metade da última década que o verdadeiro potencial que estes biocatalisadores representam em síntese orgânica começou a ser explorado. Durante este período, um grande número de reações catalisadas por enzimas foram desenvolvidas e tornaram-se familiares aos químicos orgânicos. Apesar da generalização que este tema vem

sofrendo, proporcionalmente pouco se sabe e se tem estudado sobre os fatores que determinam a especificidade da enzima durante uma determinada reação. A necessidade deste tipo de investigação está relacionada a dois fatores. O primeiro diz respeito ao fato de que se amplia rapidamente o espectro de estruturas de substratos com os quais se espera que as enzimas sinteticamente úteis sejam capazes de trabalhar. O segundo está relacionado com a necessidade de se otimizar aquelas reações onde não são obtidos resultados satisfatórios (COSTA & AMORIM, 1999).

Para o entendimento e otimização dos processos enzimáticos existe uma abordagem baseada no estudo metodológico de uma determinada enzima ou sistema. Este tipo de avaliação empírica é útil para a obtenção de informações e, além disso, pode ser empregada diretamente na otimização do processo investigado. Nos últimos anos, diferentes técnicas foram aperfeiçoadas ou desenvolvidas para o estudo e otimização de biotransformações, como por exemplo, imobilização, modificação enzimática pela engenharia genética ou via interação não-covalente (*imprinting*), reincubação do produto ou do substrato, inibição enantiosseletiva, modificação do substrato, mapeamento do sítio ativo, estudo da variação do solvente (*solvent engineering*) e estudo da variação dos doadores acila em reações de transesterificação (COSTA & AMORIM, 1999).

1.5.1 Lipases

As lipases (E.C.3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas presentes em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Em seu ambiente natural, estas enzimas possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos correspondentes e glicerol (SCHMID & VERGER, 1998; COSTA & AMORIM, 1999; VILLENEUVE *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2001). Elas são requeridas como enzimas digestivas para facilitar não apenas a transferência de

lipídios de um organismo ao outro, mas também a deposição e mobilização de gorduras que são utilizadas como reserva de energia dentro do organismo (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Além das funções metabólicas, as lipases possuem um papel importante em biotecnologia, principalmente na indústria de óleo e de alimentos, e em síntese orgânica, na preparação de compostos enantiomericamente enriquecidos (COSTA & AMORIM, 1999).

As lipases representam um grupo de biocatalisadores acessíveis e de baixo preço que, em geral, são flexíveis quanto a sua especificidade. A diferença mais importante entre as “verdadeiras” lipases e outras hidrolases, como as esterases, é a interação físico-química com seus substratos. Em contraste com as esterases, que apresentam atividade segundo o padrão cinético definido por Michaelis-Menten, ou seja, a atividade da esterase aumenta conforme a concentração do substrato aumenta, até um limite por saturação, as lipases não apresentam atividade enquanto seus substratos estão presentes na solução em estado monomérico. Contudo, quando a concentração do substrato está próxima ou ultrapassa o seu limite de solubilidade, ocorre um rápido aumento na atividade da lipase. A razão pela qual uma lipase não hidrolisa substratos que estejam abaixo de uma concentração mínima (a Concentração Micelar Crítica, CMC), porém somente em concentração acima desta, é chamada de ativação interfacial. O mecanismo de ativação interfacial está associado a mudanças conformacionais na enzima (COSTA & AMORIM, 1999).

As lipases são especialmente estáveis em solventes orgânicos. A facilidade com que estas enzimas aceitam uma variedade de substratos não-naturais e de tamanhos diversos sugere que a cadeia principal polipeptídica é flexível e pode adotar diferentes conformações. Como consequência, a baixa barreira de energia que é necessária para que ocorram mudanças conformacionais dificulta a modelagem e a previsão das interações estereoquímicas para este grupo de biocatalisadores. O fato de que muitas enzimas mantêm atividade catalítica em solventes orgânicos não possui explicação simples. A hipótese correntemente aceita

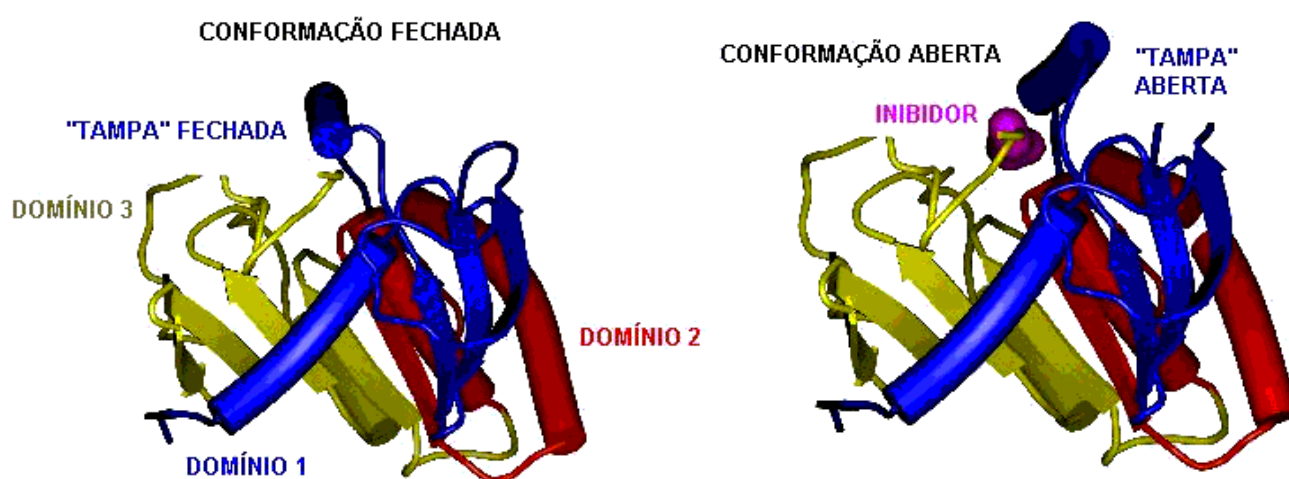
é de que, quando a enzima é colocada em um solvente orgânico anidro, esta é cineticamente congelada no estado nativo. Isto ocorre em parte devido à baixa constante dielétrica do meio, que produz uma maior efetividade nas forças eletrostáticas responsáveis pela manutenção da estrutura enzimática. Em seu ambiente natural as lipases são ativadas por uma interface lipídio-água onde a fase apolar é formada pelos próprios substratos. Em geral, o aumento da atividade de uma lipase está associado ao aumento da área de interface – ou concentração do substrato na interface (YAHYA *et al.*, 1998; COSTA & AMORIM, 1999).

A esterificação catalisada por lipases em solventes orgânicos, ou seja, síntese em ação reversa, é uma reação onde a água tem papel crucial. Uma quantidade mínima de água é necessária para que a enzima esteja na sua conformação ótima e com atividade ótima. Um excesso de água diminui a atividade da enzima dos pontos de vista cinético e termodinâmico. O nível ótimo de hidratação da enzima para atingir a atividade ótima parece ser dependente da enzima (COLUMBIÉ *et al.*, 1998; GIACOMETTI *et al.*, 2001).

Diversas estruturas de lipases são conhecidas: as de *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum*, *Mucor Miehei*, *pseudomonas glumae*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Chromobacterium viscosum*, de pâncreas de cavalo, de porco e humano. As lipases existem dentro de um amplo espectro de tamanhos e pesos moleculares. Em geral, as semelhanças entre as suas seqüências de aminoácidos estão limitadas a curtas extensões localizadas em torno do sítio ativo. Todas as lipases, com exceção das lipases pancreáticas, possuem um único domínio. Estas enzimas compartilham um padrão conformacional comum, denominado conformação α/β de hidrolase, onde está situada a tríade catalítica (Ser-His-Asp / Glu). Este arranjo, existente também nas esterases e outras enzimas relacionadas, consiste de estruturas β paralelas, flanqueadas em ambos os lados por hélices α . Uma das características mais conservadas nas lipases é o cotovelo nucleofílico, uma aguda curvatura “G” contendo o resíduo nucleofílico serina,

posicionado entre uma estrutura β e uma hélice α . Os aspectos básicos sobre a os mecanismos de catálise das lipases, incluindo o processo de ativação interfacial, foram elucidados a partir da resolução das estruturas tridimensionais de várias destas enzimas, na forma nativa e/ou na forma de complexo enzima/inibidor. Estudos realizados demonstraram a existência de duas conformações principais (figura 24), denominadas forma fechada (inativa) e forma aberta (ativa). Na conformação fechada, o sítio ativo está totalmente oculto sob um curto segmento helicoidal, formado por um ou mais *loops*, denominado de tampa (*lid*) ou aba (*flap*). Na conformação aberta, a tampa é deslocada para fora do sítio ativo, deixando-o totalmente acessível ao solvente e substrato. Neste movimento, o lado hidrófobo da tampa fica totalmente exposto, expandindo consideravelmente a superfície não-polar do sítio ativo (CAMBILLAU *et al.*, 1996; SCHMID & VERGER, 1998; YAHYA *et al.*, 1998; COSTA & AMORIM, 1999; VILLENEUVE *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2001; MARUYAMA *et al.*, 2001).

FIGURA 24 – CONFORMAÇÕES FECHADA E ABERTA DAS LIPASES



FONTE: UCSD, 2004 – modificado pelo autor.

O fenômeno da ativação interfacial é geralmente associado com a reorientação da estrutura α -helicoidal (*lid*) aumentando a hidrofobicidade da superfície

na vizinhança do sítio ativo, colocando-o a exposição. A abertura desta tampa (*lid*) pode ser iniciada após a interação com a interface lipídeo/água (YAHYA *et al.*, 1998).

Em 1989 observou-se que a levedura *Candida antarctica* produz uma lipase não-específica bastante termo-estável. Mais tarde, percebeu-se que eram dois tipos diferentes de lipases (A e B), com diferentes pontos isoelétricos (7,5 e 6, respectivamente). Os componentes purificados possuem massa molecular de 45 KDa (tipo A) e 35 KDa (tipo B). A lipase do tipo A é o componente não-específico e o mais termo-estável, e a do tipo B é industrialmente importante na síntese de glicolipídeos (UPPENBERG *et al.*, 1994).

A LBCA (Lipase B de *Candida antarctica*) provou ser uma boa alternativa para a resolução de álcoois secundários. Estudos cristalográficos revelaram que esta enzima possui a tríade catalítica consistindo de Ser-His-Asp. Além disso, parece que ela não possui o elemento que cobre o sítio ativo (*lid*). Esta característica estrutural implica no fato da LBCA não demonstrar o fenômeno da ativação interfacial (ANTHONSEN & HOFF, 1998; SALIS *et al.*, 2002). Estudos de estereoespecificidade demonstraram que existe uma especificidade do tipo 1,3 na hidrólise de glicerídeos. A região responsável pela estereoespecificidade está localizada na parte inferior do sítio ativo, próxima a serina (Ser-105) da tríade catalítica. O substrato pode ser visualizado como um bumerangue com o grupo éster ligado a Ser-105, o grupo acil como uma asa e o grupo maior sendo a outra asa. Abaixo da região da estereoespecificidade está localizado um resíduo de triptofano (Trp-104), o qual limita o tamanho desta região (ANTHONSEN & HOFF, 1998).

As lipases também podem ser classificadas em termos da especificidade em relação ao grupo acil dos triglicerídeos em dois grupos: as lipases 1,3 específicas e as não-específicas ou randomizadas. As lipases do tipo regioespecífico 1,3 hidrolisam os triglicerídeos em ácidos graxos livres, 1,2- e 2,3-diacylgliceróis e 2-monoglicerol (FARIAS *et al.*, 1997).

Um estudo realizado por ROVEL & GIRARDIN (2000), utilizou a lipase B de *Candida antarctica*, imobilizada em resina acrílica macroporosa como catalisador para a reação de esterificação entre a bixina e o L-ácido ascórbico. Através de análise por cromatografia em camada delgada, observou-se a produção de três compostos coloridos. Os dois mais apolares foram detectados como sendo a *cis-nor*-bixina e a *trans*-norbixina. Tal resultado indicou uma hidrólise parcial da bixina devido a uma pequena atividade hidrolítica da lipase. O terceiro composto foi de polaridade média e foi tido como sendo o L-ácido ascórbico covalentemente ligado. Ele foi identificado como um ascorbil éster da bixina (ROVEL & GIRARDIN, 2000).

A lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* (IM60) foi utilizada como um biocatalisador para a incorporação do ácido cáprico em óleo de peixe concentrado, usando um meio livre de solvente e outro com hexano. Ao final do estudo, se conseguiu um derivado de óleo de peixe contendo ácido cáprico, que poderia ser benéfico em certos alimentos e em aplicações nutricionais (JENNINGS & AKOH, 2001).

Recente estudo desenvolvido por MAUGARD & LEGOY (2000) sobre síntese de derivados da vitamina A em meios orgânicos verificou que foi conseguido um método eficiente através do uso de lipases na síntese de ésteres de retinila (succinato de retinila, lactato de retinila, oleato de retinila). Em adição, o lactato de retinila produzido pode ser considerado como um excelente carreador do ácido láctico, comumente usado para reduzir manchas descoloridas na pele (MAUGARD & LEGOY, 2000).

1.5.2 Reações de Síntese Catalisadas por Lipases

Como outros catalisadores, as enzimas afetam a velocidade das reações reversíveis em ambas direções. A direção tomada é determinada termodinamicamente. O deslocamento do equilíbrio de reações catalisadas por

lipases é alcançado pela mudança na concentração dos reagentes, sendo o principal a água. Através da diminuição da concentração ou da atividade da água, é teoricamente possível fazer com que a reação de hidrólise seja revertida em síntese. A produção de ésteres pode ser conseguida tanto da síntese derivada de grupos ácidos livres quanto de grupos hidroxila, ou por transesterificação (LORTIE, 1997; GUNSTONE, 1999).

O termo transesterificação diz respeito ao processo de troca de radicais acil entre um éster e um ácido (acidólise), um éster e outro éster (interesterificação) ou um éster e um álcool (alcoólise). A transesterificação é acompanhada industrialmente pelo aquecimento de uma mistura do éster anidro e outras espécies reativas em temperaturas relativamente altas. Alternativamente, metais alcalinos terrosos podem ser utilizados em temperaturas mais baixas. Entretanto, a aplicação de lipases para a modificação de gorduras e óleos por transesterificação oferece a vantagem de condições brandas de trabalho, redução de reações secundárias e especificidade (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Todas essas reações são processadas através da formação de um intermediário acil-enzima, seguido de um ataque nucleofílico. A grande diferença está no fato de que na acidólise e na interesterificação, uma reação de hidrólise precisa acontecer primeiro para liberar o nucleófilo que irá atacar o intermediário formado com o grupo acil do novo éster a ser produzido (LORTIE, 1997).

1.5.2.1 Acidólise

A rota mais simples e direta para a síntese de lipídeos estruturados do tipo MLM (triglicerídeos contendo ácidos graxos de cadeia média nas posições 1 e 3 e um ácido graxo essencial de cadeia longa na posição 3 do esqueleto glicerol) é a acidólise entre o triglicerídeo de cadeia longa e ácidos graxos livres de cadeia média catalisada por lipases do tipo 1,3 específicas. A presença de produtos de reação

incompleta de esterificação parcial como di- e monoglicerídeos deve ser minimizada. Entretanto, estes produtos são inevitavelmente formados, pois são intermediários na reação de acidólise, já que esta ocorre através de passos de hidrólise de triglicerídeos e esterificação dos diglicerídeos formados com os ácidos graxos livres disponíveis (PÁEZ *et al.*, 2003).

1.5.2.2 Alcoólise

A reação de esterificação entre álcoois poliídricos e ácidos graxos livres é a reação inversa da hidrólise do acilglicerol correspondente. A relação entre as velocidades da reação direta (hidrólise) e da reação inversa (esterificação) é usualmente controlada pelo conteúdo de água do meio de reação. Um grau elevado de incorporação dos AGPI (Ácidos Graxos Poliinsaturados) ao glicerol foi relatado por OSADA *et al.* com as lipases de *Chromobacterium viscosum* (89-90%) e *Cândida cylindracea* (70%), sugerindo ser este um método praticável para produção de acilgliceróis ricos em AGPI. Posteriormente, foi relatado que a lipase obtida de *Mucor miehei* também era capaz de incorporar os AGPI ao glicerol. O grau de esterificação é altamente dependente das condições de reação, em especial do conteúdo de água reacional para que a hidrólise seja evitada (CARVALHO *et al.*, 2003).

1.5.2.3 Interesterificação

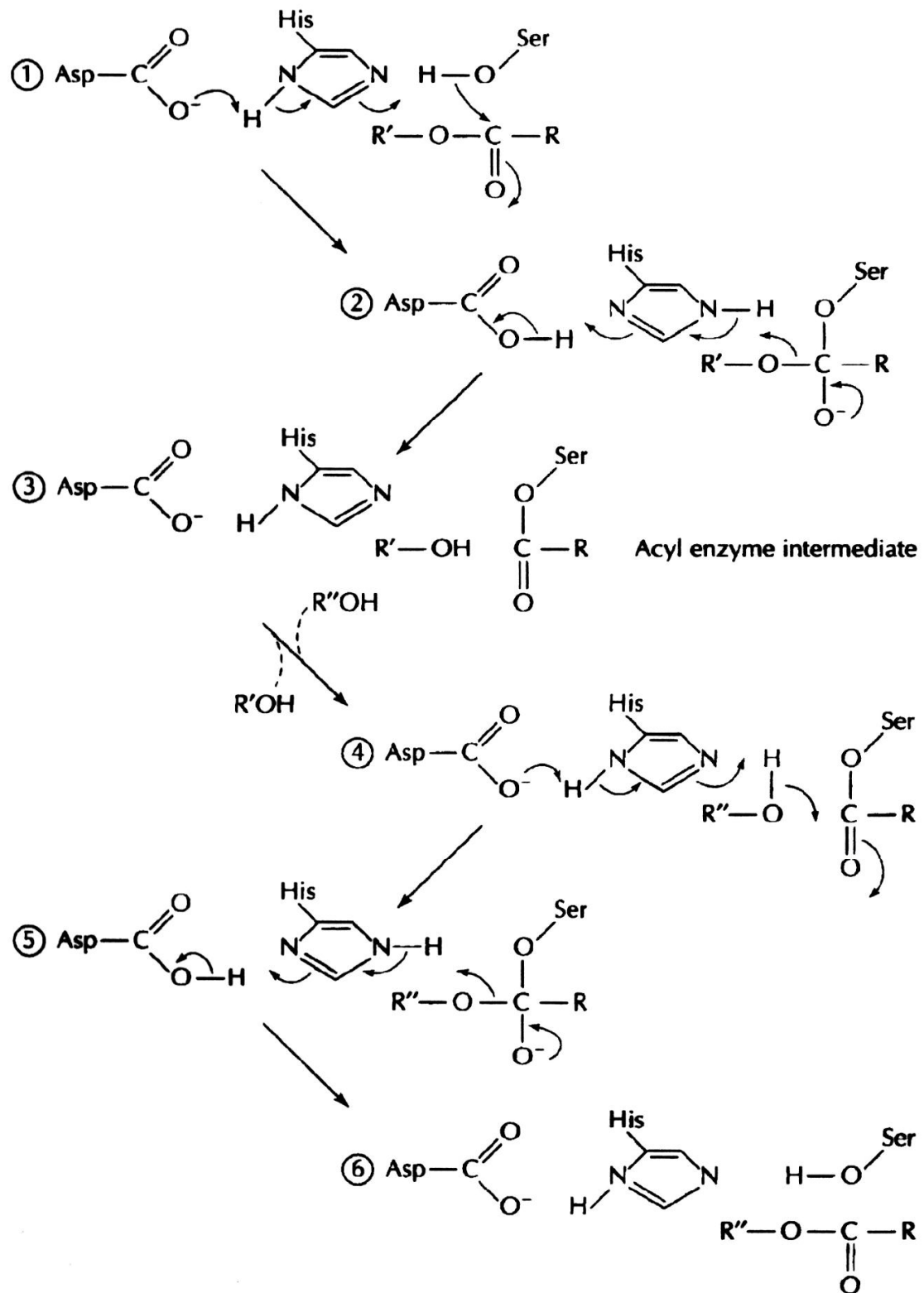
As interesterificações catalisadas por enzimas oferecem possibilidades para a transformação de gorduras e óleos. A reação enzimática de interesterificação tem algumas características em comum com as reações da química clássica correspondente, mas os princípios que governam a regioespecificidade são diferentes e justificam, em muitos casos, a utilização dos processos enzimáticos (MARANGONI & ROUSSEAU, 1995; CARVALHO *et al.*, 2003). Usualmente as

lipases são classificadas em randômicas (sem especificidade) e em específicas (1,3 regio-específicas). Alguns exemplos de lipases randômicas incluem as cepas de *Candida rugosa*, *Geotrichum candidum* e *Staphylococcus aureus*. As lipases específicas incluem a lipase pancreática, *Mucor miehei*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens* e *Rhizopus arrhizus* (MARANGONI & ROUSSEAU, 1995).

A reação de interesterificação consiste de seis etapas (figura 25). No primeiro passo, o sítio ativo da serina ataca o carbono da carbonila de um triglicerídeo ou, como mostrado na figura, um ácido graxo não-dissociado, formando um intermediário tetrahédrico. O papel dos resíduos de histidina e ácido aspártico é o de fazer os grupos hidroxila da serina nucleófilos mais fortes sem o requerimento de condições básicas drásticas. Este intermediário tetrahédrico é estabilizado por grupos amida específicos. A ligação carbono-oxigênio do éster é subsequente clivada (passo 3), liberando tanto uma molécula de álcool ou água, dependendo se o substrato tenha sido um triglicerídeo, um metil éster de ácido graxo ou um ácido graxo. No passo quatro, uma molécula de álcool vai reagir com o intermediário acil da enzima, novamente formando um intermediário tetrahédrico, que vai se rearranjar (passos 5), liberando um triglicerídeo novo e regenerando o sítio ativo (passo 6) da serina (MARANGONI & ROUSSEAU, 1995).

Na reação de interesterificação, o triglicerídeo reage com um ácido graxo, um álcool ou outro éster, resultando em rearranjo na distribuição dos ácidos graxos do triglicerídeo formando um novo triglicerídeo, com propriedades químicas e físicas diversas. O rearranjo é o resultado de reações concorrentes de hidrólise e esterificação. Em geral, sob condições nas quais a quantidade de água no sistema é restrita, a hidrólise de gordura pode ser minimizada de tal forma que a interesterificação seja a reação dominante.

FIGURA 25 – ETAPAS DA REAÇÃO DE INTERESTERIFICAÇÃO



FONTE: MARANGONI & ROUSSEAU, 1995.

A reação de interesterificação tem demonstrado aumentar significativamente os níveis de AGPI nos acilgliceróis resultantes. A obtenção de acilgliceróis contendo 70% de AGPI ω , em especial o ácido docohexaenóico (DHA) (48%) e o ácido eicopentaenóico (EPA) (12%), foi realizada via interesterificação de óleo de fígado de bacalhau e concentrados de AGPI livres, ou seus ésteres, catalisada por lipase imobilizada de *Mucor miehei*. A mesma enzima foi usada para a obtenção de óleo de sardinha contendo 25% de EPA e 40% de DHA após acidólise entre o óleo de sardinha e AGPI livres na ausência de solvente. Na seleção de lipases microbianas utilizadas para aumentar os níveis de AGPI do óleo de sardinha após reação de acidólise, a lipase de *Pseudomonas* sp apresentou a maior capacidade entre as lipases testadas, tendo o conteúdo total destes ácidos graxos atingido 44% nos acilgliceróis, comparado com 29% do óleo de sardinha original (CARVALHO *et al.*, 2003).

Com base em tudo o que foi apresentado nesta revisão de literatura pode-se concluir que os carotenóides de origem natural estão sendo cada vez mais procurados, devido à existência de uma recente e crescente aversão a produtos de origem sintética pelos consumidores. Entretanto, ambos apresentam qualidades que devem ser aproveitadas, como a capacidade de agirem como agentes antioxidantes. Fica claro que esta habilidade dos carotenóides está intimamente relacionada a sua estrutura, e por isso, qualquer alteração desta deverá alterar sua função. Este trabalho tem como justificativa então, a necessidade de comparação da atividade antioxidantes de carotenóides de origem natural e sintética, já que muitos das substâncias comercializadas mostraram não apresentar qualquer tipo de toxicidade ao organismo humano. Além disso, se a estrutura do carotenóide é a chave para o processo de seqüestro de radicais livres, se torna imprescindível saber que tipo de alteração (física, química ou enzimática) irá causar mudanças nas funções dos carotenóides.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista que os carotenóides são amplamente utilizados na indústria de alimentos e de cosméticos, por apresentarem propriedades benéficas ao organismo humano, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de carotenóides de fontes naturais e produzidos sinteticamente, bem como estabelecer quais os efeitos provocados por modificações químicas, físicas e enzimáticas nesta habilidade bioquímica exercida por carotenóides.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar modificações em carotenóides através da utilização de meios físicos (complexação com ciclodextrina e quitosana);
- b) Verificar o efeito dos processos de centrifugação e sonicação na solubilidade dos complexos de inclusão;
- c) Realizar modificações em carotenóides através da utilização de meios químicos (acetilação);
- d) Realizar modificações em carotenóides através da utilização de meios enzimáticos (esterificação com lipases);
- e) Avaliar a atividade antioxidante de alguns carotenóides naturais e sintéticos antes e após as modificações física, química e / ou enzimática realizadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Estão apresentados neste capítulo os principais materiais e equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho, bem como as metodologias experimentais empregadas.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Carotenóides de Origem Natural

Os carotenóides de origem natural utilizados neste trabalho foram a bixina e o licopeno. A bixina foi extraída das sementes do urucum. As sementes utilizadas aqui foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jair S. Pinto, então na Universidade de São Paulo, unidade de São Carlos.

3.1.2 Carotenóides de Origem Sintética

Os carotenóides sintéticos utilizados neste trabalho foram: Carophyll Pink 8%[®] (astaxantina), Carophyll Red 10%[®] (cantaxantina), Carophyll Yellow 10%[®] (etil éster do ácido apocarotenóico) - produtos comerciais cedidos pela Hoffmann-La Roche Laboratórios. Também utilizou-se o padrão de β -caroteno (Sigma Chemical Corporation, Saint Louis) e o licopeno que foi extraído da preparação comercial.

3.1.3 Ciclodextrina

Neste trabalho foi utilizado o padrão de ciclodextrina do tipo beta (β), cedido pelas empresas CERESTAR (Dr. Roland Beek) – Vilvord, Bélgica e CYCLOLAB (Prof. Josef Szejtli) – Budapest, Hungria.

3.1.4 Quitosana

A amostra comercial de quitosana utilizada nesta pesquisa (practical grade from crab shells) foi adquirida da Sigma Chemical Corporation, Saint Louis).

3.1.5 Lipases

As enzimas ensaiadas neste trabalho (LIPOZYME[®] TL IM e NOVOZYME[®] 435, adsorvidas em resina macroporosa) foram cedidas pela empresa Novozymes A/S, Denmark[®]. A lipase bovina foi proveniente da Sigma Chemical Corporation, Saint Louis.

A enzima NOVOZYME[®] 435 é uma lipase de *Candida antarctica* (B) produzida por fermentação submersa do microorganismo *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado e adsorvida em resina macroporosa (NOVOZYMES, 2002).

3.1.6 Outros Materiais

Todos os solventes utilizados possuíam grau analítico. O álcool etílico, o pirofosfato de sódio e o ácido acético foram adquiridos da empresa Sigma Chemical Corporation, bem como as amostras do β -caroteno, de α,α -difênil- β -picrilhidrazila (DPPH^{*}) e do ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromana-2-carboxílico (Trolox C).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Extração e Purificação dos Carotenóides

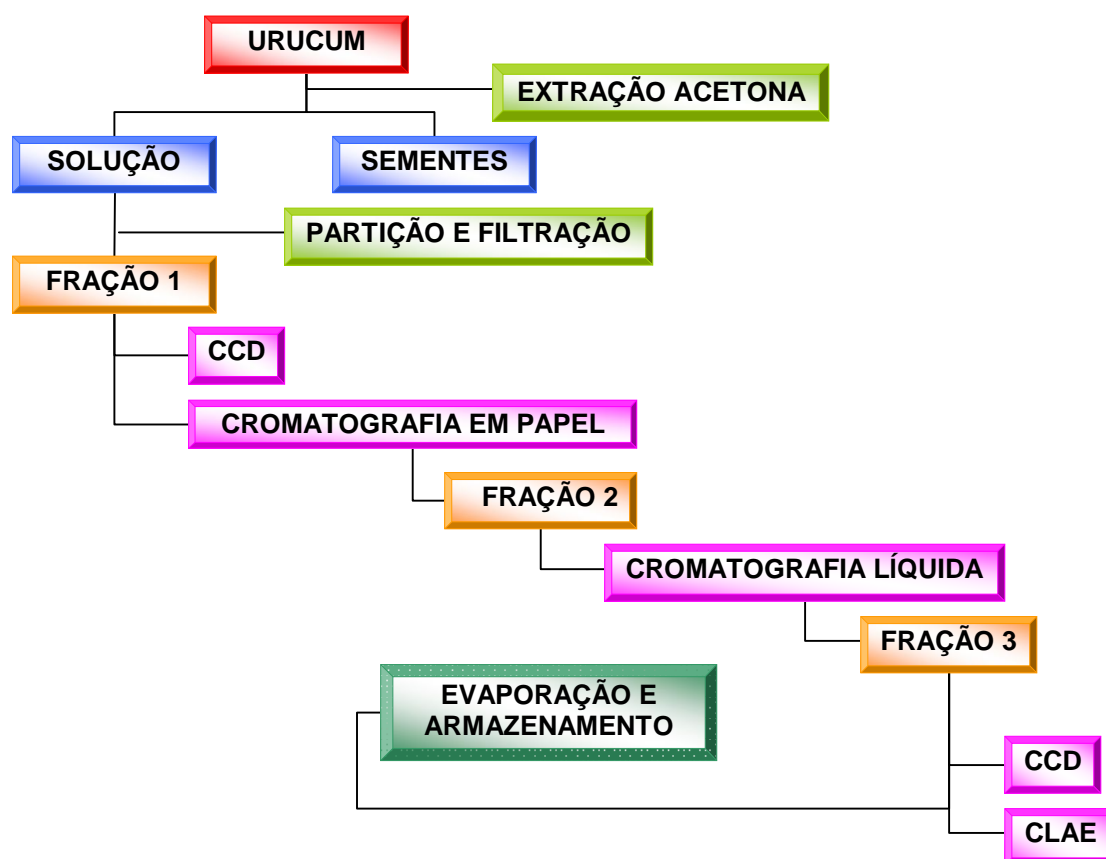
Não existe um procedimento padrão para a extração dos carotenóides devido à ampla variedade de produtos alimentares e animais que contêm esses compostos, e devido à grande gama de carotenóides que podem ser encontrados nessas

amostras. Geralmente, inicia-se o processo de extração dos carotenóides de produtos alimentares com metanol (MeOH) ou uma mistura de MeOH e outro solvente mais apolar, tal como clorofórmio. Outros preferem usar a acetona isoladamente ou em combinação com éter de petróleo. Após a extração inicial, o extrato ainda contém alguns contaminantes lipídicos polares, os quais podem ser removidos pelo particionamento em água ou soluções aquosas salinas (OLIVER & PALOU, 2000).

No presente trabalho, as amostras de carotenóides também foram submetidas a extrações com solventes orgânicos (figura 26). O urucum teve os pigmentos de suas sementes extraídos com a ajuda de acetona. As sementes foram embebidas neste solvente, protegidas da luz e do calor, sob atmosfera de nitrogênio por 24 horas. Após 3 extrações seqüenciais com acetona realizadas nas sementes de urucum, os extratos totais obtidos foram particionados com excesso de água e clorofórmio por três vezes. A fase aquosa foi descartada e a fase clorofórmica foi filtrada por camada de sulfato de potássio anidro, para a remoção de água residual, resultando na FRAÇÃO 1. Esta foi submetida à análise em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para a verificação do seu grau de pureza. Após tal procedimento, verificou-se que ainda se fazia necessário uma melhor purificação da amostra, pois esta ainda continha vários outros lipídios não correlatos (ex: TAG – triacilgliceróis). De maneira mais rápida, conseguiu-se isolar a bixina através do uso da técnica de cromatografia em papel. Quando o extrato bruto da amostra foi aplicado em papel 3MM e o solvente de corrida utilizado foi éter de petróleo:n-propanol (96:4), observou-se que a cor indicativa do pigmento permaneceu na origem. Esta faixa foi então recortada, triturada em liquidificador para facilitar a liberação do pigmento do papel com a utilização da acetona (FRAÇÃO 2). Para uma maior purificação da amostra, a fração 2 foi submetida à cromatografia líquida em coluna, utilizando como fase estacionária sílica-gel 60 foi realizada uma eluição seqüencial com hexano, clorofórmio, acetona e metanol. As frações obtidas foram

analisadas por CCD (tolueno:acetato de etila:acetona – 87:7:6) e a alíquota proveniente da eluição com acetona foi considerada a mais pura (FRAÇÃO 3). Essa fração foi então também analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em cromatógrafo líquido LC-10AT VP (Shimadzu Corporation, Kyoto) equipado com coluna de fase reversa tipo LC18 de GODS munida de pré-coluna (*guard-column*), utilizando-se como fase móvel isocrática apenas acetonitrila, com um fluxo de 1 ml/min e pressão de 700 psi. A amostra final foi submetida à evaporação em câmara de vácuo de uma centrífuga Savant. A solução-estoque foi submetida a fluxo de nitrogênio, envoltas em papel alumínio e armazenadas a 18°C negativos.

FIGURA 26 – ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS CAROTENÓIDES DO URUCUM

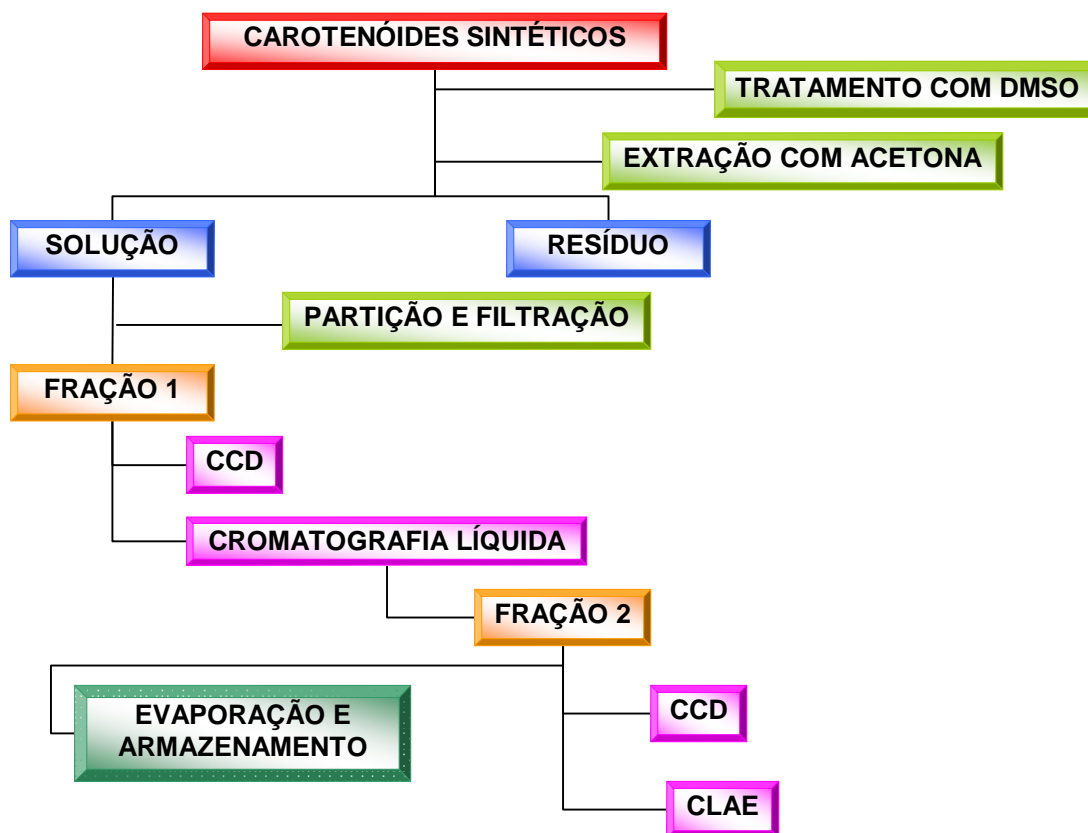


CCD = cromatografia em camada delgada realizada em sílica-gel 60 utilizando como fase móvel tolueno:acetato de etila:acetona (85:8:7); CROMATOGRAFIA EM PAPEL = cromatografia realizada em papel 3MM e tendo como fase móvel éter de petróleo:n-propanol (96:4); CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, com fase móvel isocrática (acetonitrila), fluxo de 1 ml/min e pressão de 700 psi. Os demais procedimentos estão descritos no texto.

A extração dos pigmentos das complexas formulações dos carotenóides sintéticos (Carophyll Pink 8%[®], Carophyll Red 10%[®] e Carophyll Yellow 10%[®]) está esquematizada na figura 27. As amostras foram tratadas com dimetilsulfóxido (DMSO) (para desagregação das micropartículas protéico-glicídicas constantes da formulação original), e após 20 minutos, foi adicionada a acetona para extração dos pigmentos. Elas foram submetidas ao fluxo de nitrogênio e protegidas da luz e do calor. Após o período de 24h, as amostras foram particionadas e filtradas em camada de sulfato de potássio anidro (FRAÇÃO 1), da mesma forma que para a amostra do urucum. Esta fração foi analisada por CCD (idem ao urucum) e foi submetida a uma cromatografia líquida. A fase estacionária utilizada foi sílica-gel 60 e os eluentes utilizados foram o hexano e a acetona, de forma seqüencial. A alíquota onde estava presente o pigmento (colorida – FRAÇÃO 2) foi considerada como a amostra pura. O grau de pureza destas amostras foi verificado através de CCD tendo como fase estacionária sílica (SG-60 – Merck) e o solvente de corrida utilizado foi composto por tolueno:acetato de etila:acetona (85:8:7). As cromatoplasas obtidas foram fotograficamente documentadas ao natural (sem revelação), após revelação com vapores de iodo ou com anisaldeído sulfúrico a quente. As amostras também foram analisadas por CLAE em cromatógrafo líquido LC-10AT VP (Shimadzu Corporation, Kyoto) equipado com coluna de fase reversa tipo LC18 de GODS munida de pré-coluna (*guard-column*), utilizando-se como fase móvel isocrática apenas acetonitrila, com um fluxo de 1 ml/min e pressão de 700 psi. A evaporação e o armazenamento das amostras foram efetuados da mesma maneira que para o urucum.

As amostras de β -caroteno e de licopeno foram solubilizadas em clorofórmio e centrifugadas. O sobrenadante deste processo teve o mesmo procedimento de evaporação e armazenamento realizado com as outras amostras.

FIGURA 27 – ESQUEMA DE EXTRAÇÃO DOS CAROTENÓIDES SINTÉTICOS



CCD = cromatografia em camada delgada realizada em sílica-gel 60 utilizando como fase móvel tolueno:acetato de etila:acetona (85:8:7); CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, com fase móvel isocrática (acetonitrila), fluxo de 1 ml/min e pressão de 700 psi. Os demais procedimentos estão descritos no texto.

Para fins simplificados de estimativa quantitativa de carotenóides utilizou-se o que foi deduzido e generalizado por SCHIEDT & JENSEN (1995) ou seja, a uma absorbância de 0,25 (no comprimento de onda máximo do respectivo carotenóide) corresponde, em média, 1 μg de carotenóide por ml de solvente.

3.2.2 Modificação dos Carotenóides por Meios Químicos

3.2.2.1 Acetilação

Uma alíquota de astaxantina (2 ml) foi evaporada, adicionada de anidrido

acético (2,5 ml) e / ou piridina (0,2 ml). Esta mistura foi levada a aquecimento (90°C) por 15 minutos. Após este período, foi realizada uma partição com clorofórmio e gelo em fusão em excesso para resgatar a amostra acetilada na fase inferior. O produto obtido desta reação foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência para comparação dos tempos de retenção obtidos com o carotenóide reagente e os derivados acetilados. Para confirmar a acetilação os carotenóides acetilados foram tratados com NaOH (1 molar) e aquecidos (cerca de 70°C) por 5 minutos. Os produtos resultantes foram particionados com CHCl_3 e água em excesso. A fase inferior foi re-analisada por CLAE. A comprovação da eficiência do método pode ser vista pela retomada dos tempos de retenção da amostra original.

3.2.3 Modificação de Carotenóides por Meios Físicos

A interação entre hóspede e hospedeiro no complexo de inclusão entre derivados cíclicos de amido (ciclodextrinas) e compostos apolares pode ser investigada por meio de uma série de técnicas físicas e químicas como a espectroscopia, titulações potenciométricas, estudos de cinética e de solubilidade. Estes métodos físico-químicos são aplicáveis sem dificuldades no estudo dessas interações quando as moléculas hóspedes e hospedeiras são solúveis em água. Entretanto, se tornam limitados quando o hóspede é menos solúvel ou insolúvel em soluções aquosas (MIYAKE, 1999).

Em muitos casos, o produto da complexação é uma mistura de moléculas complexadas, ainda acompanhadas de hóspedes e ciclodextrinas livres. É necessário então, que se determine o conteúdo do hóspede no produto de complexação, se esta molécula está realmente incluída na cavidade da ciclodextrina e a relação entre moléculas livres e complexas. Sendo assim, foram realizados alguns tipos de experimentos para a verificação da real formação do complexo carotenóide/ β -CD.

3.2.3.1 Formação de complexos de inclusão com β -ciclodextrina

A formação do complexo de inclusão carotenóide/ β -CD foi realizada com a utilização de mini-colunas contendo a β -CD em pó (1 g). A este material foi adicionado 1,2 ml de uma solução de astaxantina (31 mg/ml) ou bixina, que após penetração na ciclodextrina, foi levada à secura em centrífuga a vácuo Savant.

3.2.3.1.1 Formação do complexo

Como as soluções de ciclodextrinas são incolores e os carotenóides coloridos são lipossolúveis, se o produto hidrossolúvel resultante da complexação possuir cor, pode-se dizer que houve a formação do complexo. Esta análise foi realizada utilizando-se uma solução aquosa do complexo β -CD/carotenóide (5 mg/ml) que após centrifugação, teve o seu sobrenadante lido em espectrofotômetro UV/visível (UV-1650 PC, da Shimadzu Cooperation, Kyoto, Japan) na faixa de absorção de luz visível ($\lambda_{\text{máx}}$ de 470 e 450 nm, respectivamente para astaxantina e bixina).

3.2.3.1.2 Efeito da sonicação sobre a solubilidade do complexo

Seqüencialmente ao processo de formação do complexo, as amostras dos complexos β -ciclodextrina/carotenóides foram sonicadas (imersas em banho de gelo) por 3 ciclos seqüenciais de sonicação (30 segundos), descanso (30 segundos) e sonicação (30 segundos) em aparelho de ultra-som operando a $\frac{3}{4}$ de potência e 25 Hz, para alcançar uma maior solubilidade. Após este processo, as amostras seguiram o mesmo procedimento realizado anteriormente para espectrofotometria para observação do incremento dos valores de absorbância.

3.2.3.1.3 Efeito da adição de etanol sobre a solubilidade do complexo

Foi testada a possível influência da adição de etanol na solubilidade do

complexo. Alíquotas de etanol (1 a 10% - concentração final) foram adicionadas aos complexos (5 mg/ml) após o processo de centrifugação (centrífuga não-refrigerada a 1200 x g) e de sonicação dos mesmos. As absorbâncias dos complexos foram lidas nos respectivos comprimentos máximos de absorção.

3.2.3.1.4 Efeito da re-adição de carotenóide sobre a solubilidade do complexo

Outro parâmetro que foi testado foi se o complexo formado já estaria saturado com o carotenóide ou não. Para isso, foram adicionadas alíquotas de 10 a 100 μ L (31 mg/ml) de carotenóide ao complexo já formado, então centrifugado novamente a 1200 x g e cada absorbância foi lida e comparada.

3.2.3.1.5 Efeito da re-adição de ciclodextrina sobre a solubilidade do complexo

A adição posterior de ciclodextrina extra ao complexo já formado também foi alvo de estudo. Para isso, foram adicionadas alíquotas de 10 a 100 μ g de ciclodextrina ao complexo já formado após centrifugação (1200 x g) e sonicação (3 ciclos seqüenciais de sonicação – 30 segundos, descanso – 30 segundos e sonicação – 30 segundos em aparelho operando a $\frac{3}{4}$ de potência e 25 Hz) e cada absorbância foi lida e comparada.

3.2.3.2 Complexação com Quitosana

Uma amostra de quitosana (1,5 g) foi solubilizada em 100 ml de ácido acético 1% ou em solução de HCl em pH 1, 2 ou 3 sob constante agitação magnética durante 24 horas. A interação entre carotenóides e quitosana foi realizada pela simples adição de uma solução saturada dos carotenóides em acetona na solução acidificada de quitosana. A realização do complexo entre os carotenóides (bixina e astaxantina) foi verificada através da formação de esférulas coloridas de quitosana

complexada com o carotenóide.

3.2.3.2.1 Formação das esférulas de quitosana

A formação das esférulas de quitosana se deu através do gotejamento de uma solução contendo a quitosana (solubilizada em ácido acético a 1% ou HCl em pH 1, 2 ou 3 - controle) ou o complexo formado por esta com o carotenóide (teste) em uma solução aniônica de pirofosfato de sódio em concentrações crescentes (0%, 1%, 2%, 4% ou 8%). A formação dessas esférulas, quando acontece, é praticamente instantânea. Foram testadas possíveis diferenças na forma de secagem desse material (ar livre ou liofilização) e no tempo de permanência das esférulas na solução aniônica. A formação das esférulas de quitosana foi avaliada através de registro fotográfico das mesmas e da medida do peso e do tamanho das esférulas obtidas em cada situação ensaiada.

3.2.4 Modificação de Carotenóides por Meios Enzimáticos

3.2.4.1 Esterificação dos Carotenóides pela Ação de Lipases

Para a realização do experimento de esterificação foram testadas lipases de *Candida antarctica* (Novozym[®] 435 e Lipozyme[®] TL IM, Novozymes S/A, Denmark) e uma lipase bovina do tipo II (Sigma Chemical Corporation., Saint Louis). Seguindo a metodologia de HUMEAU *et al.* (2000) com algumas modificações. A reação foi inicializada pela mistura da enzima (5 vezes a quantidade de carotenóide) na fase orgânica composta por acetona (2 ml), L-ácido ascórbico (mesma quantidade da enzima, utilizado como substrato para a reação) e o carotenóide (de 3 a 5 mg) e colocadas sob constante agitação e abrigadas ao escuro por 72 horas a uma temperatura de aproximadamente 35°C. Após o término da reação as amostras foram particionadas com clorofórmio e água em excesso, para retirada da vitamina C

hidrossolúvel que não tenha sido utilizada na reação.

O resultado dessa reação de interesterificação é a ligação da molécula de vitamina C ao carotenóide testado (bixina ou astaxantina), formando o ascorbil éster da bixina ou da astaxantina tanto na forma *trans* quanto na *cis*. Este ascorbil éster deve resultar da esterificação direta do ácido carboxílico presente nos pigmentos estudados ou por reações de transesterificação (HUMEAU *et al.*, 2000).

3.2.5 Avaliação da Atividade Antioxidante

Vários métodos têm sido recentemente desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante total de amostras biológicas. Nestes métodos, a inibição da ação do radical livre é mensurada através de dois parâmetros: o tempo de inibição e o grau da inibição (WANG, 1996; RE *et al.*, 1999).

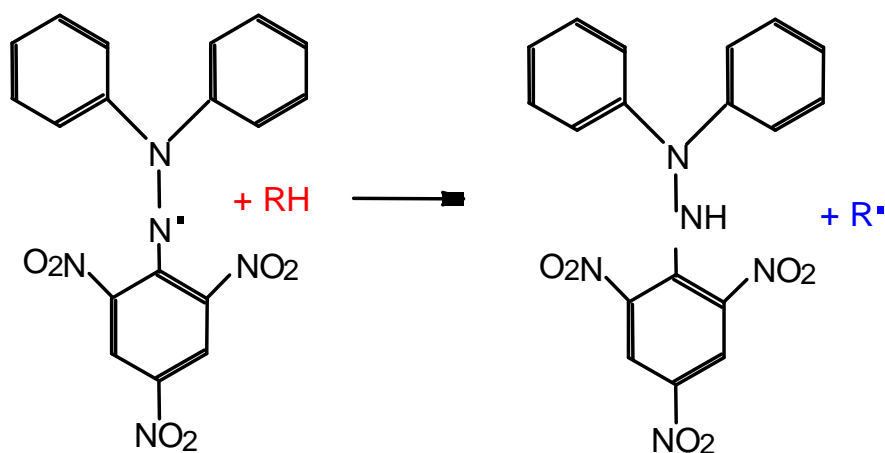
Os métodos de detecção e medição da concentração de radicais livres estão baseados nas características de alta reatividade química e momento magnético resultante, sendo descritos como químicos e físicos (SLATER, 1992).

3.2.5.1 Avaliação pelo Método de Reatividade com o radical livre estável DPPH[•]

O radical livre α,α -difeníl- β -picrilhidrazila (DPPH) é intensamente violeta e possui um espectro de absorção bem definido na faixa de 515 - 520 nm. Este método pode ser usado como uma estratégia de monitoramento de reações entre DPPH[•] e agentes antioxidantes, devido a formação da difenilpicrilhidrazina (forma reduzida do DPPH[•]), que resulta na perda da cor violeta, originalmente devida ao paramagnetismo conferido pelo seu elétron desemparelhado (BLOIS, 1958; NOMURA, 1997). Assim sendo, foram realizados experimentos utilizando o DPPH[•], baseando-se na propriedade deste composto de aceitar um elétron ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula diamagnética estável na presença de uma molécula antioxidante (figura 28). A descoloração é estequiometricamente

proporcional ao número de elétrons consumidos na reação.

FIGURA 28 – ESTABILIZAÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH



FONTE: YAMAGUCHI *et al.*, 1998

3.2.5.1.1 Espectrofotometria

O método de NOMURA (1997) foi utilizado com algumas modificações. Todas as amostras de carotenóides, do ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromana-2-carboxílico (Trolox C) e de DPPH[•] em solução etanólica foram armazenadas em congelador sob atmosfera de nitrogênio. As concentrações de antioxidantes variaram de 0 a 80 μ moles/litro e a concentração do DPPH[•] foi mantida fixa em 80 μ moles/litro. O volume final foi ajustado para 1 ml através da adição de etanol. O controle da reação foi preparado da mesma forma, mas sem a adição de nenhum antioxidante e o etanol foi utilizado para a construção da linha de base. Imediatamente após a adição do radical livre, as amostras foram agitadas em vortex por 15 segundos e colocadas ao abrigo da luz. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente (24°C) por 20 minutos. O consumo do DPPH[•] foi determinado pela diminuição da absorbância máxima a 515 nm em um espectrofotômetro UV/visível (UV-1650 PC, da Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) utilizando o antioxidante correspondente como tubo branco. A atividade antioxidante foi expressa

como porcentagem de descoloração do DPPH• e calculada pela fórmula que segue (equação 1) (NOMURA *et al.*, 1997; WETTASINGHE *et al.*, 2000; LIM *et al.*, 2001; KOLEVA *et al.*, 2002; GORINSTEIN *et al.*, 2003).

$$\%AA = \frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Outros autores como AMOROWICZ *et al.* (2004) utilizam fórmulas um pouco diferentes para calcular a porcentagem de descoloração do DPPH• como forma de estimar a atividade de seqüestrar este radical de substâncias antioxidantes (equação 2). No entanto, o resultado das duas metodologias é o mesmo.

$$\%ASR = 100 \times \left(\frac{1 - A_E}{A_D} \right) \quad (\text{Equação 2})$$

Os carotenóides provêm um desafio adicional já que suas características vão de substâncias polares a não-polares, o que pode causar diferente solubilidade em vários solventes (ZANG *et al.*, 1997). Tipicamente, a quantificação de carotenóides foi realizada pela medida da absorbância de soluções estoque em solventes e utilizou-se estes valores para calcular a concentração dos carotenóides. Com o uso desta técnica, o valor reportado no solvente utilizado depende do coeficiente de extinção molar (ϵ) do carotenóide em questão. Os valores dos coeficientes de extinção molar dos carotenóides utilizados neste trabalho estão expostos na tabela 1, bem como os valores de absorbância correspondentes a 1 $\mu\text{g/ml}$ e de 1 $\mu\text{mol/litro}$ da respectiva solução do carotenóide.

TABELA 1 – VALORES DE COEFICIENTE DE EXTINÇÃO MOLAR DOS CAROTENÓIDES

CAROTENÓIDE	ε (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	solvente	1 µg/ml (A)*	10 µmoles/l**	Pm g/mol
Astaxantina	126000	470 ^a	Hexano	0,21	6 µg/ml	600
β-caroteno	138240	450 ^b	Hexano	0,256	5,4 µg/ml	540
Bixina	113040	450	clorofórmio	0,2862	4 µg/ml	400
Cantaxantina	118650	470 ^a	ciclohexano	0,21	5,65 µg/ml	565
DPPH*	12500	515 ^b	Clorofórmio	0,032	4 µg/ml	400
Etil éster ác. Ap.	117300	450 ^a	Ciclohexano	0,255	4,6 µg/ml	460
Licopeno	186300	472 ^b	Hexano	0,345	5,4 µg/ml	540
Trolox C	2995	290 ^b	Etanol	0,012	2,5 µg/ml	250

FONTES: ^aLATSCHA, 1990; ^bHART & SCOTT, 1995

Os dados de ε , $\lambda_{\text{máx.}}$ e solvente e peso molecular foram coletados da literatura;

* o valor da absorbância correspondente a 1 µg/ml de solução a 1% e caminho ótico de 1 cm foi calculado através do valor do coeficiente de extinção molar;

** a quantidade de µg/ml de solução de carotenóide presente em 10 µmoles/litro foi calculado a partir do peso molecular de cada carotenóide.

Levando-se em conta estas considerações, as concentrações dos carotenóides utilizados foram calculadas em relação ao sobrenadante da solução em etanol após centrifugação e foram realizados os devidos cálculos de porcentagem real solubilizada. Também foi realizado em experimento para se verificar qual a influência do solvente nos valores do coeficiente de extinção molar de cada substância utilizada e chegou-se a conclusão de que a diferença entre o solvente citado na literatura e o etanol (solvente de escolha para a realização dos experimentos) foi menor do que 5% - dados não mostrados. Por tal razão, foram utilizados os mesmos coeficientes de extinção molar citados na literatura (LATSCHA, 1990; HART & SCOTT, 1995).

3.2.5.1.2 Cromatografia em camada delgada dos produtos de ação redox

Com o objetivo de verificar a existência de alterações na molécula do carotenóide após a reação com o DPPH[•] nas mesmas condições propostas no item anterior foram realizadas análises de cromatografia em camada delgada das amostras resultantes da reação redox entre o radical livre e o antioxidante. As amostras, bem como os seus respectivos padrões, foram aplicadas em placas de sílica-gel 60 após 20 min de reação em diversas concentrações. A fase móvel utilizada foi composta por tolueno:acetato de etila:clorofórmio (87:7:6). Tais placas foram analisadas sem revelação (visível e UV), após revelação com iodo ou com anisaldeído sulfúrico a quente. Com este experimento é possível se ter uma visão do que acontece com os dois componentes da reação (carotenóide e o radical livre), através do desaparecimento gradual da mancha colorida correspondente a cada componente observado.

3.2.5.2 Determinação da estequiometria da reação DPPH[•] / antioxidante

Para a realização deste ensaio foi utilizada a metodologia proposta por BONDET *et al.* (1997). Diferentes concentrações foram testadas para cada antioxidante. Uma alíquota da solução do antioxidante foi adicionada à solução de DPPH[•]. A concentração inicial de DPPH[•] foi de 80 μ moles/L. A absorbância das soluções foi lida em 515 nm até que a reação atingisse um platô de descoloração. A porcentagem residual de DPPH[•] foi determinada em função das concentrações, e a concentração de cada antioxidante que conseguiu consumir com a maior quantidade do DPPH[•] foi utilizada para se determinar a estequiometria da reação.

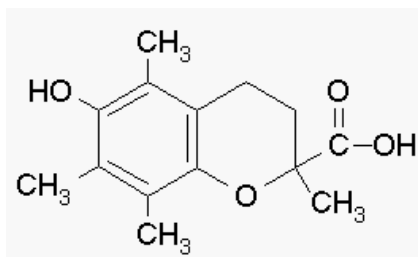
A estequiometria (σ , número de moléculas de DPPH[•] reduzidas por uma molécula de antioxidante), foi definida através da relação entre a quantidade de moléculas do radical livre consumidas na reação e a quantidade de moléculas de antioxidante presentes na reação (equação 3).

$$\sigma = \frac{\mu\text{mol de DPPH consumido}}{\mu\text{mol de antioxidante utilizado}} \quad (\text{equação 3})$$

3.2.5.3 Ensaio de equivalência da capacidade antioxidante total do Trolox C relativa ao DPPH^{*} - TEAC_{DPPH}

Recentemente muita atenção tem sido dada a determinação da capacidade antioxidante total de compostos usando o Ensaio de Equivalência da Capacidade Antioxidante do Trolox (TEAC – *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*). O Trolox C é um análogo hidrossolúvel da vitamina E (α -tocoferol), no qual o grupo fitil (lipofítila) é substituído por uma simples carboxila (figura 28).

FIGURA 29 – ESTRUTURA QUÍMICA DO TROLOX C



FONTE: DELICADO *et al.*, 1997.

Desta forma, foi realizado neste trabalho um ensaio de equivalência da capacidade antioxidante total do Trolox C, mas utilizando-se como radical livre o DPPH e não o ABTS^{•+}. Para a realização deste ensaio, foi considerada a concentração residual do DPPH^{*} após reação com cada carotenóide. Este valor foi comparado com o resíduo do radical livre obtido com a mesma concentração do Trolox C (equação 4).

$$TEAC = \frac{\mu\text{mol de DPPH residual obtido com o carotenóide}}{\mu\text{mol de DPPH residual obtido com o Trolox C}} \quad (\text{equação 4})$$

3.2.5.4 Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Amostras com volume total de 1000 µL de etanol foram adicionadas de 100 µl de DPPH[•] (concentração final do DPPH[•] = 80 µmoles/L) e 100 µl do antioxidante (concentração final variável de acordo com o carotenóide utilizado). A solução foi agitada em vortex e deixada ao abrigo da luz e em temperatura ambiente por 20 minutos. Após este período a solução foi transferida para um tubo capilar de quartzo. Como padrão de antioxidante foi utilizada uma amostra de Trolox C. Os espectros de RPE foram registrados em temperatura ambiente e em baixa temperatura (77°K) de nitrogênio líquido, em espectrofotômetro Bruker ESP 300E operando em Banda-X (9,5 GHz) empregando 100 kHz de frequência de modulação do campo magnético. Os valores dos parâmetros de RPE foram obtidos por tratamento e simulação dos espectros experimentais com o auxílio dos programas de computador Win-EPR[®] e SimFonia[®]. O equipamento utilizado para este experimento encontra-se no LABEPR, do Departamento de Química desta Universidade. A atividade antioxidante das amostras foi calculada usando a equação 5, definida por WETTASINGUE *et al.* (2000), onde a intensidade do sinal foi calculada pela altura do segundo dos cinco picos correspondentes ao sinal do DPPH[•] (HIRAMATSU *et al.*, 1994).

$$\% \text{ Seqüestro} = 100 - \left(\frac{\text{intensidade do sinal}_{\text{amostra}}}{\text{intensidade do sinal}_{\text{controle}}} \times 100 \right) \quad (\text{equação 5})$$

Os experimentos de ressonância paramagnética de elétrons foram realizados no Laboratório de Ressonância Paramagnética de Elétrons do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, pelo Professor Doutor Antônio Sálvio Mangrich.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em duas ou mais replicatas. A análise estatística dos dados foi realizada através da análise da variância (ANOVA). O teste-t de Student foi utilizado para obter a diferença significativa entre os dados, utilizando como critério de significância o valor de $p < 0,05$. Os dados estão representados como média \pm desvio-padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão apresentados e discutidos os resultados dos vários ensaios realizados, conforme metodologia descrita no capítulo anterior.

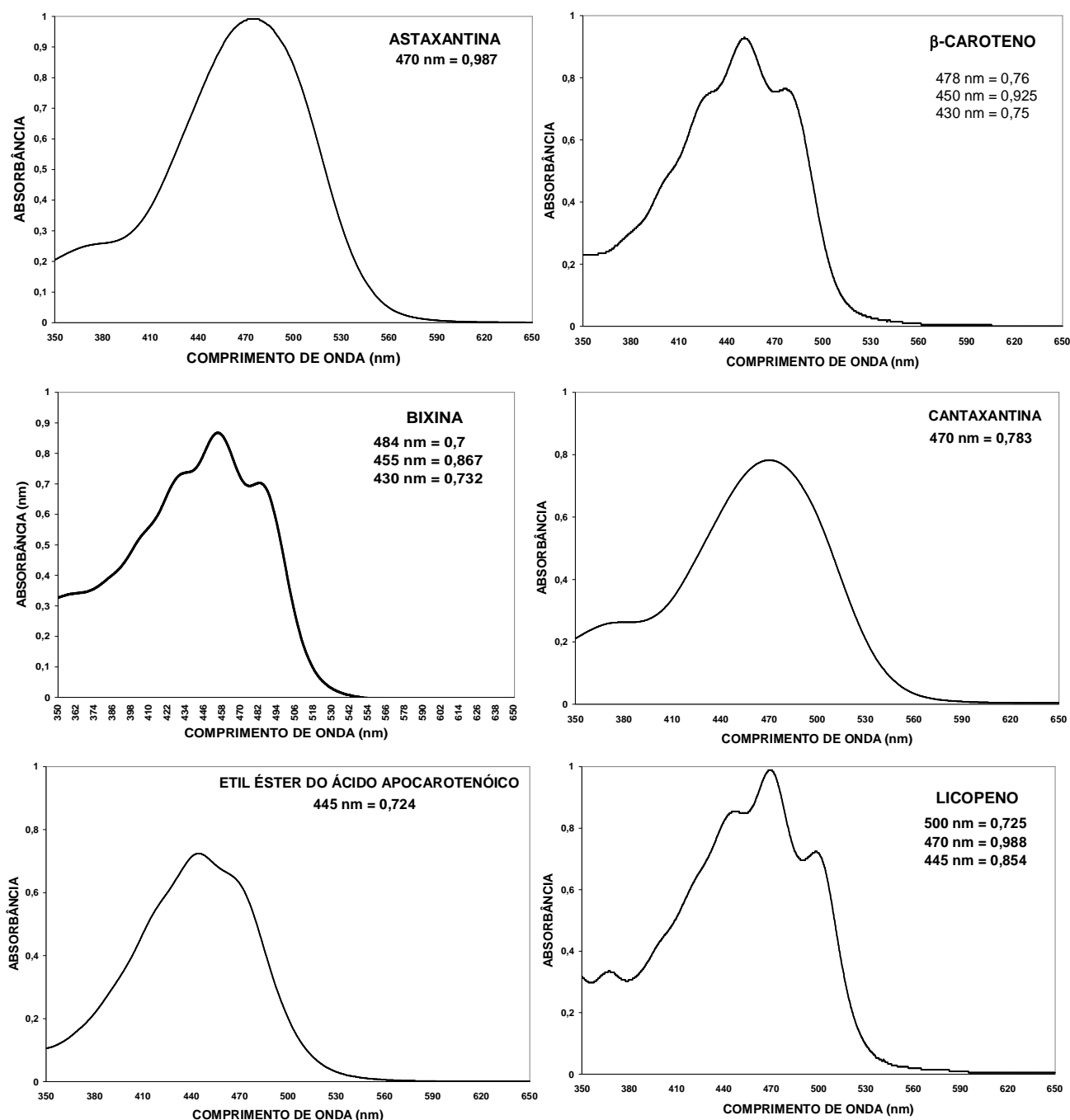
4.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS CAROTENÓIDES

A separação por fases, cromatografia em camada delgada e a cromatografia líquida são métodos utilizados para obter padrões de carotenóides puros. Normalmente para se obter um padrão puro de carotenóide são necessários dois ou três passos de purificação (OLIVER & PALOU, 2000).

O urucum possui como pigmentos carotenóides principais a bixina e a *nor*-bixina. As duas estruturas bicarboxílicas nos carbonos distais, diferem exatamente pelo detalhe de mono-metilação presente apenas na bixina, que é o pigmento majoritário e é insolúvel em água. As amostras comerciais de licopeno, β -caroteno, Carophyll Pink[®] 8%, Carophyll Red[®] e Carophyll Yellow[®], fontes de astaxantina, cantaxantina e etil éster do ácido apocarotenóico respectivamente, utilizadas neste trabalho, foram extraídas conforme já descrito em Material e Métodos.

Primeiramente, cada amostra analisada teve um espectro de absorção de luz visível construído, utilizando para solubilização o solvente a ser usado nos experimentos que seguem – o etanol (figura 30). Para a amostra de bixina dissolvida em etanol, verificou-se a presença de três picos máximos de absorção: 430, 445 e 484 nm. Sabe-se que 80% do poder colorante do urucum é devido a bixina (WURTZ, 1988; NAKANO, 1991; FAO, 1999). A literatura cita valores de absorção máxima para estes carotenóides de 443, 475 e 509,5 nm em clorofórmio (MERCK INDEX, 1983), aproximados portanto, com os da amostra em estudo apesar da diferença do solvente utilizado. Todas as outras amostras mostraram perfis espectrofotométricos bem relacionados com os dados disponíveis em literatura (MERCK INDEX, 1983).

FIGURA 30 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DAS AMOSTRAS DE CAROTENÓIDES



As análises foram realizadas com todas as amostras solubilizadas em etanol e os espectros obtidos na região de luz visível são representativos de 3 experimentos independentes. As concentrações utilizadas foram: astaxantina = 7,7 $\mu\text{moles/L}$; β -caroteno = 6,7 $\mu\text{moles/L}$; bixina = 7,6 $\mu\text{moles/L}$; cantaxantina = 6,6 $\mu\text{moles/L}$; etil éster do ácido apocarotenóico = 6,2 $\mu\text{moles/L}$ e o licopeno = 5,3 $\mu\text{moles/L}$.

Também foram realizadas análises de cromatografia em camada delgada com as amostras em estudo. As cromatoplasmas foram inspecionadas imediatamente

após a corrida no solvente utilizado, após revelação com iodo e com anisaldeído sulfúrico à quente para a detecção de outros tipos de carotenóides incolores e/ou contaminantes. Os resultados destas análises não revelaram a existência de nenhum contaminante nas amostras.

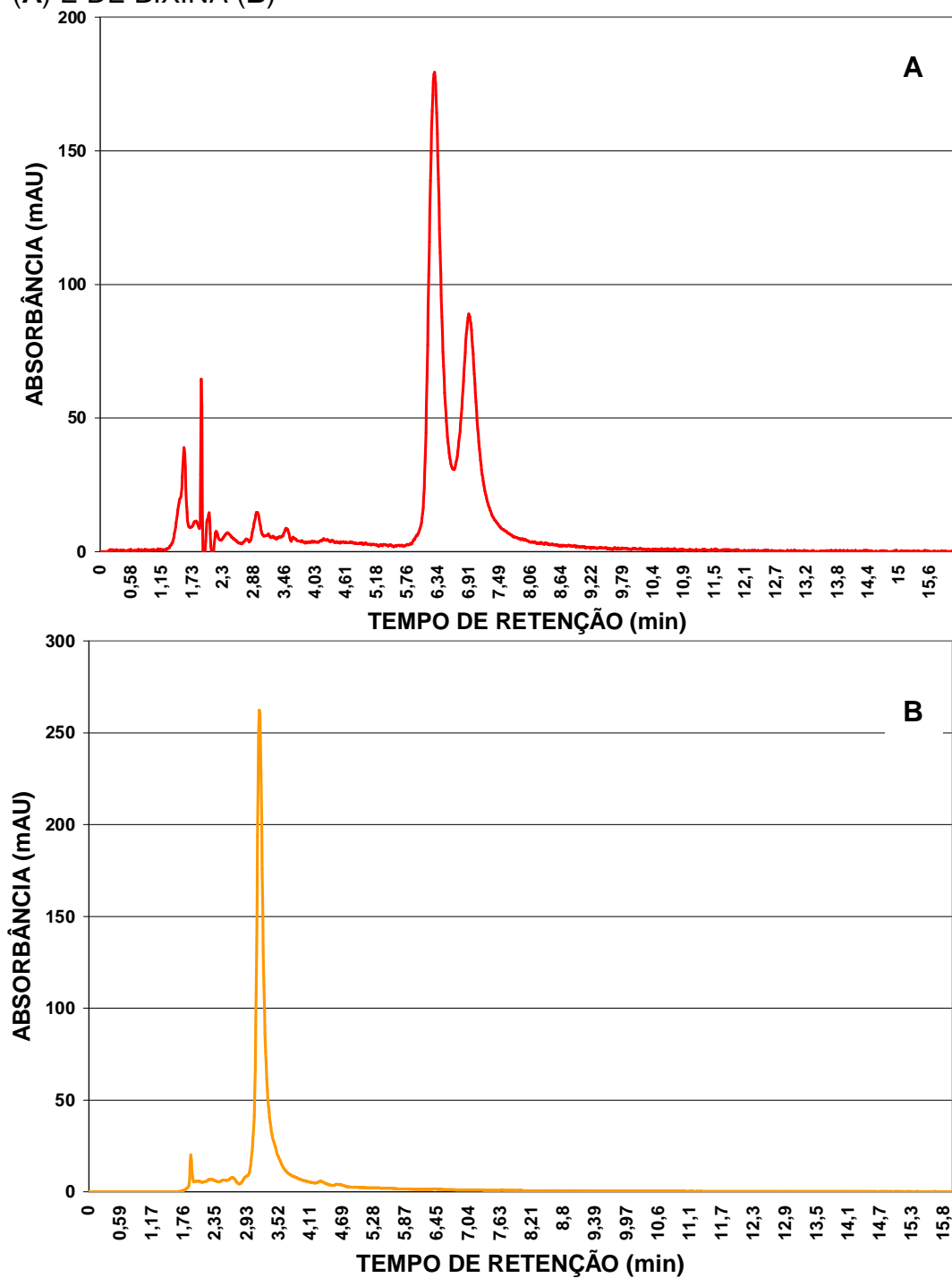
As determinações dos níveis de carotenóides freqüentemente utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência por causa da sua habilidade de distinguir estruturas similares dos carotenóides. A identificação dos carotenóides está baseada nos tempos de retenção e na comparação com padrões puros assim como a cromatografia com padrões adicionados à amostra (TAUNGBODHITHAM *et al.*, 1998).

Baseando-se na informação acima, foi realizado um experimento de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando uma coluna LC-18, que é a mais comumente utilizada para a separação de carotenóides por ser compatível com a maioria dos solventes e útil para toda a faixa de polaridade dos carotenóides disponível no mercado. Com este experimento tornou-se possível a comprovação do grau de pureza da amostra, corroborando os outros métodos de caracterização já mencionados. Analisando os cromatogramas das amostras de astaxantina e de bixina na figura 31 (A e B), pode-se notar a presença de dois picos representativos da amostra de astaxantina, demonstrando a presença de isômeros deste carotenóide. Tal afirmação é confirmada com a presença de duas bandas que migram praticamente juntas nas cromatografias em camada delgada realizadas com a astaxantina (dados mostrados posteriormente), e com outros exemplos já citados na literatura de que compostos isômeros são eluídos como pares geminados com tempos de retenção próximos (PFANDER & RIESEN, 1995). Os tempos de retenção encontrados foram os de 6 min 26 s e 7 min para os picos 1 e 2, respectivamente. Já a análise da amostra da bixina, após todos os processos de purificação pelos quais esta passou, revelou apenas a presença de um pico, com tempo de retenção em 3 min e 15 segundos. Neste trabalho só estão mostrados os cromatogramas da

astaxantina e da bixina por serem estes os carotenóides de maior interesse neste estudo.

FIGURA 31 – CROMATOGRAMAS DE CLAE DAS AMOSTRAS DE ASTAXANTINA

(A) E DE BIXINA (B)



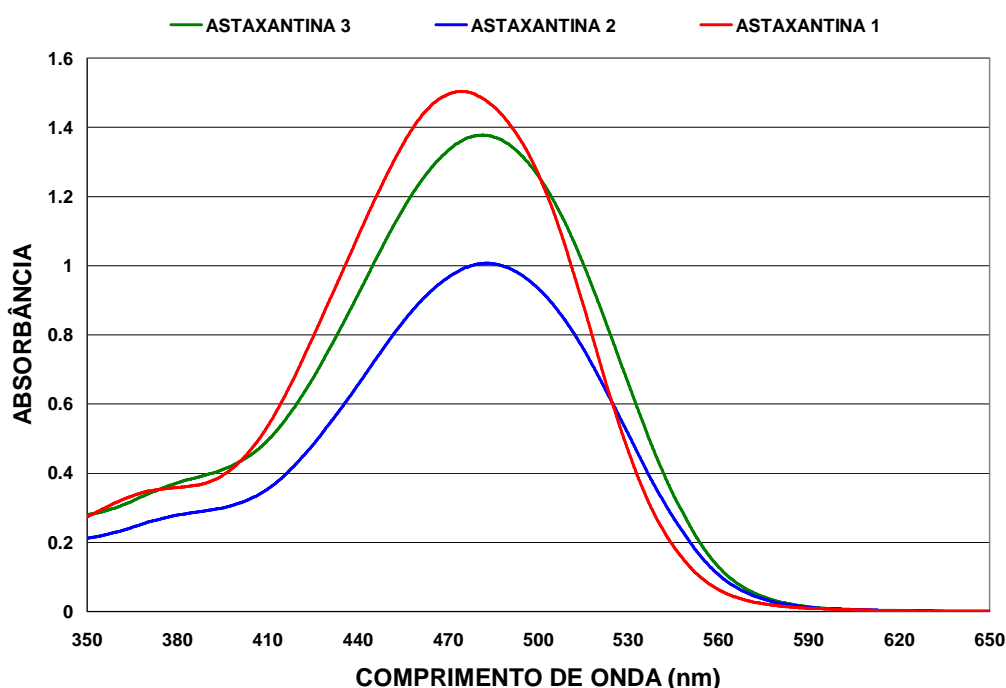
Os cromatogramas acima mostram o tempo de retenção (min) referente a astaxantina - A (1,4 μ moles/L) e a bixina - B (2,3 μ moles/L) em solução de acetonitrila. A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo líquido utilizando como fase móvel isocrática a acetonitrila, com um fluxo de 1 ml/min e uma pressão de 700 psi.

4.2 MODIFICAÇÃO DE CAROTENÓIDES POR MÉTODOS QUÍMICOS

4.2.1 Acetilação

Os procedimentos realizados para a acetilação da amostra de astaxantina tiveram sua efetividade verificada através de espectrofotometria e de métodos cromatográficos. O espectro de absorção na região da luz visível da amostra de astaxantina (figura 32) mostra que as duas formas de acetilação utilizadas (reação apenas com anidrido acético ou reação com anidrido acético na presença de piridina) tiveram como resultado uma amostra com uma absorbância levemente menor do que a da amostra padrão, e sem nenhuma alteração no seu perfil espectrofotométrico.

FIGURA 32 – ESPECTRO DE VARREDURA NA REGIÃO DO VISÍVEL DAS AMOSTRAS DE ASTAXANTINA PADRÃO E ACETILADAS

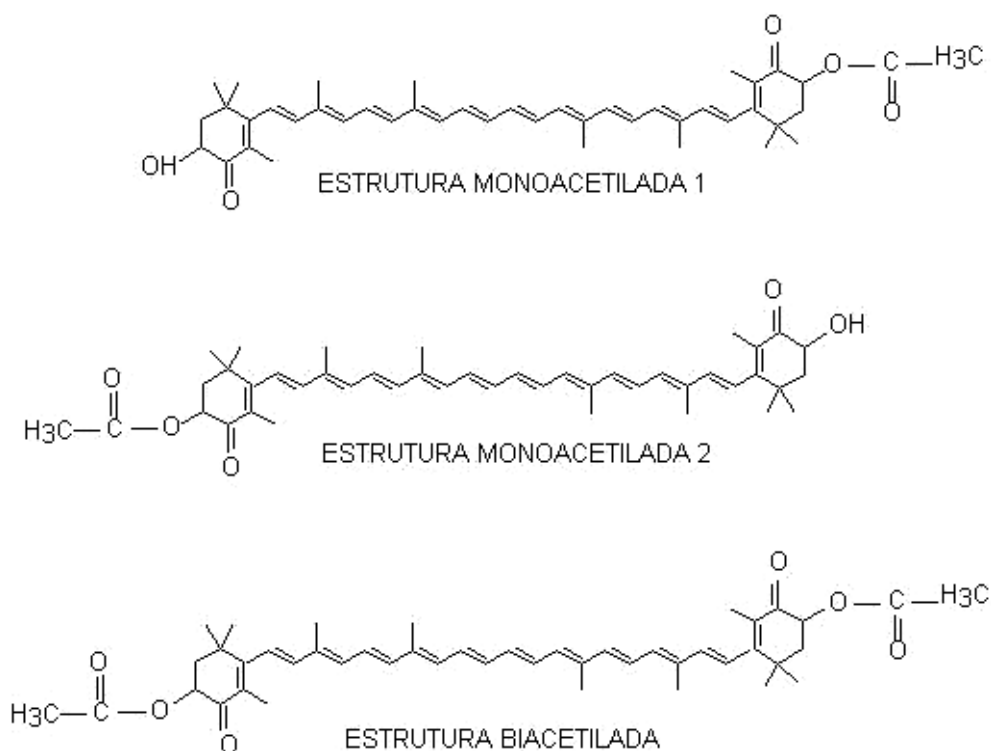


As análises foram realizadas com as amostras solubilizadas em etanol e na concentração de 7 $\mu\text{moles/L}$. A linha azul corresponde à amostra de astaxantina tratada com anidrido acético (astaxantina 2); a linha verde a amostra acetilada com anidrido acético e piridina (astaxantina 3) e a linha vermelha representa a amostra sem tratamento (astaxantina 1). As curvas mostradas são representativas de 3 leituras independentes.

Além disso, percebe-se um ligeiro efeito bactocrômico. A amostra acetilada apenas com anidrido acético (astaxantina 2) teve o seu $\lambda_{\text{máx}}$ alterado para 483 nm e a fração tratada com anidrido acético e piridina (astaxantina 3) revelou um $\lambda_{\text{máx}}$ de 480, ambos estando levemente deslocados para uma região de maior comprimento de onda do que a amostra padrão ($\lambda_{\text{máx}} = 470$ nm).

A reação de acetilação só ocorre em substâncias que contenham grupos hidroxila na presença de temperatura e do anidrido acético e/ou piridina. A amostra de astaxantina que foi submetida a acetilação pode ter gerado pelo menos três formas do seu derivado acetilado (figura 33): estrutura monoacetilada 1, estrutura monoacetilada 2 ou uma estrutura biacetilada. Estas estruturas podem estar presentes na solução tanto de forma isolada (a presença de apenas uma delas) quanto na forma de uma mistura das três estruturas formadas.

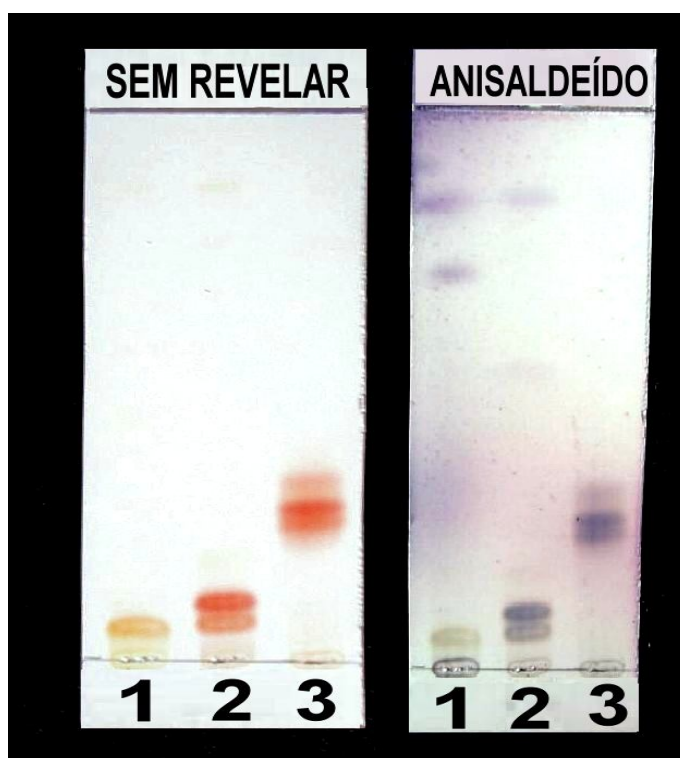
FIGURA 33 – DERIVADOS ACETILADOS DA ASTAXANTINA



FONTE: o autor.

Quando estas amostras foram analisadas através da cromatografia por camada delgada (CCD), pode-se observar que a amostra de astaxantina acetilada com anidrido acético e piridina sofreu uma clara alteração na sua migração, alterando o seu valor de R_f (fator de retenção) de 0,06 e 0,11 para 0,26 e 0,34 (figura 34).

FIGURA 34 – CROMATOPLACA DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DA AMOSTRA DE ASTAXANTINA ACETILADA



Foram utilizadas cromatoplasas de sílica-gel 60 que estiveram submetidas à cromatografia utilizando com fase móvel tolueno:acetato de etila:acetona, na proporção de 87:7:6 (v/v). A anotação na placa de SEM REVELAR indica o resultado da cromatografia logo após a corrida, sem a utilização de nenhum método de revelação; a anotação de ANISALDEÍDO indica que a cromatoplasa foi revelada com anisalaldeído sulfúrico à quente; os números 1, 2 e 3 representam a amostra tratada com anidrido acético (astaxantina 2), a amostra padrão (astaxantina 1) e a amostra tratada com anidrido acético e piridina (astaxantina 3), respectivamente.

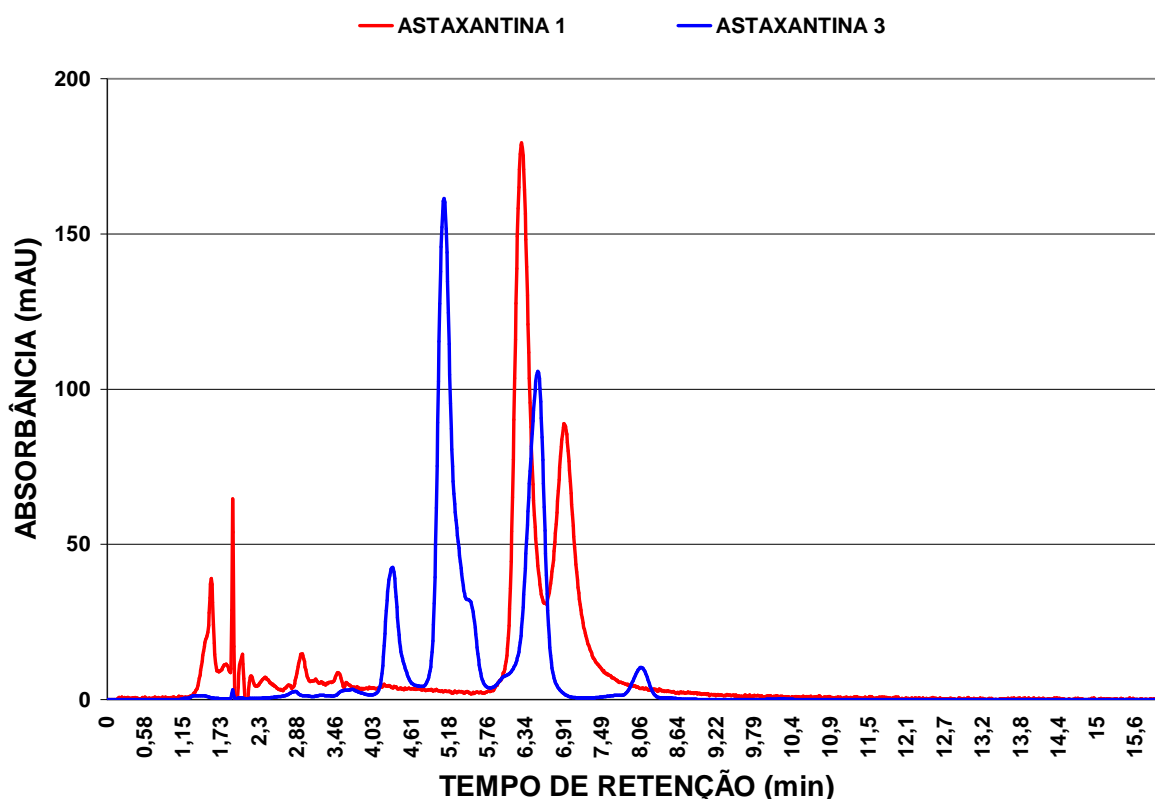
Outra alteração que fica bastante evidenciada pela CCD é mudança na coloração da banda correspondente a amostra de astaxantina tratada com apenas anidrido acético – astaxantina 2 (de vermelho vivo altera-se para laranja) e o desaparecimento da segunda banda aparente na amostra padrão. Na análise da

cromatoplaça revelada com anisaldeído parece ter ocorrido o surgimento de pelo menos mais uma banda no extremo superior da placa. Como já foi dito anteriormente, a amostra de astaxantina padrão apresentou em todas as análises feitas de CCD duas bandas muito próximas (R_f de 0,06 e 0,11), provavelmente indicando a presença de isômeros deste carotenóide. É interessante notar que na amostra com a adição de piridina, as duas bandas migraram juntas e parece ter havido uma inversão na concentração desses isômeros (a banda mais intensamente colorida na amostra padrão sempre é a com R_f mais alto e na amostra em questão, a intensidade da cor foi transferida para a banda de migração mais lenta). A revelação com anisaldeído sulfúrico a quente não foi capaz de revelar nenhum outro tipo de alteração que estas duas últimas amostras possam ter sofrido.

Infelizmente, a CCD por si só, não é capaz de afirmar se as amostras foram realmente acetiladas ou não. Para isso, realizou-se um experimento de CLAE onde se comparam as alterações sofridas nos perfis e nos tempos de retenção obtidos no cromatograma (figura 35). Foram corridas amostras de astaxantina padrão e seu derivado tido como acetilado (reação realizada com anidrido acético e piridina, por ter se mostrado a mais eficiente nos ensaios com CCD).

A astaxantina mostrou ter seu cromatograma alterado após a reação química catalisada. Os tempos de retenção dos picos correspondentes à amostra padrão deslocaram-se de 6min 26s e 7min para 5min 1s e 6min 52s (amostra tratada com anidrido e piridina – astaxantina 3). Além disso, a amostra de astaxantina 3 revelou o aparecimento de dois outros picos (4min 32s e 8min). No entanto, esta alteração no cromatograma não é o suficiente para provar que a amostra havia realmente sido acetilada.

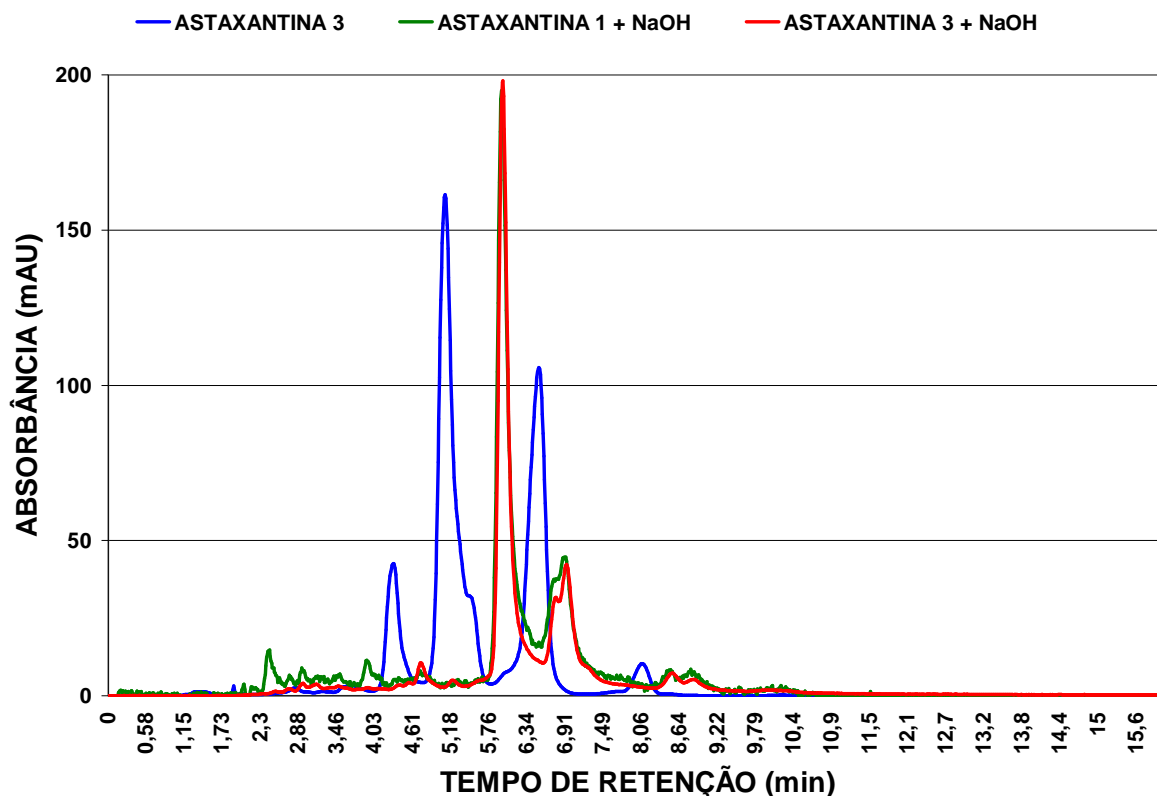
FIGURA 35 – CROMATOGRAMA DE CLAE DAS AMOSTRAS DE ASTAXANTINA MODIFICADAS POR VIA QUÍMICA



Os cromatogramas acima mostram o tempo de retenção (min) e a absorbância (mAU) referente a astaxantina padrão na concentração de $1,4 \mu\text{moles/L}$ (astaxantina 1) e a astaxantina acetilada com anidrido acético e na presença de piridina (astaxantina 3) na mesma concentração, em solução de acetonitrila. A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo líquido utilizando como fase móvel isocrática a acetonitrila, com um fluxo de 1 ml/min e uma pressão de 700 psi .

Como meio de comprovação de que as mudanças aparentes no cromatograma da astaxantina 3 eram resultantes da acetilação, foi feito o passo contrário da reação (desacetilação) na amostra tida como acetilada. Tanto a amostra padrão quanto a amostra modificada quimicamente foram submetidas a um tratamento alcalino ($\text{NaOH } 1 \text{ mol/L}$, 65°C , 15 min) para a hidrólise dos grupos acetil. Se realmente ocorreu a acetilação da amostra, o perfil do cromatograma da amostra de astaxantina 3 tratada com NaOH deverá retornar a um perfil bastante semelhante ao da amostra padrão (astaxantina 1). Através da figura 36, foi possível observar que a hipótese lançada acima ocorreu, ou seja os grupos acetil da amostra de astaxantina 3 tratada com NaOH foram hidrolisados.

FIGURA 36 – CROMATOGRAMA DE CLAE DAS AMOSTRAS DE ASTAXANTINA ACETILADAS APÓS TRATAMENTO COM NaOH



Os cromatogramas acima mostram o tempo de retenção (min) e a absorbância (mAU) referente às amostras de astaxantina padrão tratada com NaOH (astaxantina 1 + NaOH), astaxantina acetilada com anidrido acético na presença de piridina (astaxantina 3) e da astaxantina 3 tratada com NaOH (astaxantina 3 + NaOH). Todas as amostras estavam na concentração de 1,4 $\mu\text{moles/L}$ e em solução de acetonitrila. A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo líquido utilizando como fase móvel isocrática a acetonitrila, com um fluxo de 1 ml/min e uma pressão de 700 psi.

Pode-se perceber que novamente a amostra de astaxantina 3 (acetilada com anidrido acético na presença de piridina) não mostrou o mesmo perfil da amostra padrão de astaxantina que foi tratada com NaOH. No entanto, a amostra tratada com anidrido acético e piridina exposta a NaOH (astaxantina 3 + NaOH) apresentou tempos de retenção e perfil cromatográfico coincidentes ao da amostra original do carotenóide padrão também tratado com NaOH (astaxantina 1 + NaOH). Sendo assim, pode-se dizer que a astaxantina foi realmente objeto de uma reação de acetilação.

4.3 MODIFICAÇÃO DE CAROTENÓIDES POR MEIOS FÍSICOS

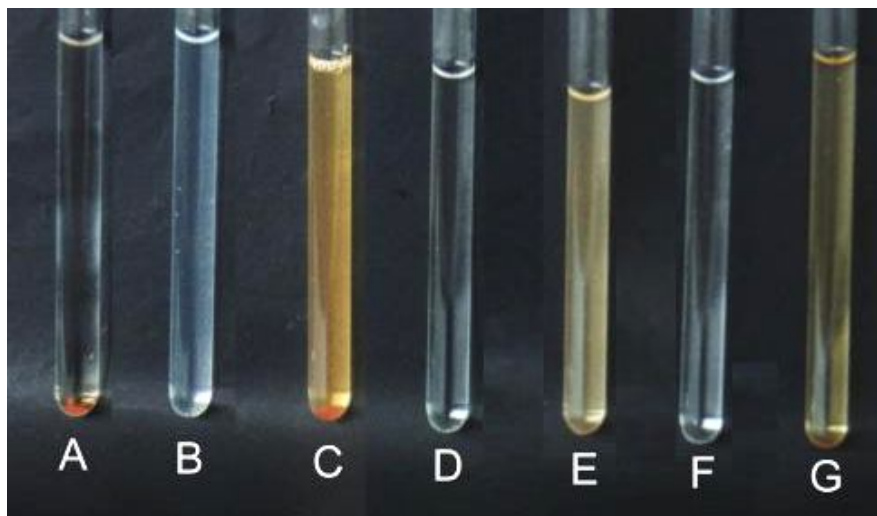
4.3.1 Formação de Complexos de Inclusão com β -ciclodextrina

Vários estudos vêm sendo utilizados para o preparo de complexos de inclusão. Em um estudo realizado por YOSHII *et al.* (1998) foram adicionadas soluções contendo até 20 mmol/L da molécula hóspede a 0,5 ml de etanol. Esta solução foi adicionada em 500 mg de ciclodextrina e vigorosamente misturada em vortex por um minuto, para obter-se uma suspensão de ciclodextrina e solvente. O xarope obtido foi incubado em banho de água à 30°C por 24 horas. Após centrifugação (500 x g) por 15 minutos, o sobrenadante foi retirado e seco sob vácuo à 80°C por 5 horas. Contudo, Tenjarla *et al.* (1998) utilizaram-se das técnicas de moagem extensiva (*kneading*) e posterior liofilização.

No Laboratório de Químio-Biotecnologia de Biomassa desta universidade optou-se por uma variante para formar os complexos de inclusão entre a astaxantina e ciclodextrinas através de uma simples percolação de uma solução acetônica de astaxantina em micro-colunas com a ciclodextrina na forma de pó. Após total penetração da solução de astaxantina no leito de ciclodextrina, o conjunto foi levado à secar sob vácuo até que se obteve um pó colorido de cada amostra de ciclodextrina utilizada.

O resultado obtido na complexação de ciclodextrinas e a bixina está exposto na figura 37, onde é possível se ter uma idéia do poder de formação de complexos de inclusão no que diz respeito ao incremento da hidrossolubilidade de compostos lipofílicos, como a bixina. Nesta figura mostra-se a bixina insolúvel em água e seqüencialmente em pares, três tipos de ciclodextrinas solubilizadas em água e os três complexos obtidos com a bixina, também solubilizados em água.

FIGURA 37 – COMPROVAÇÃO VISUAL DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO ENTRE CAROTENÓIDES E CICLODEXTRINAS



As anotações representadas nesta figura são exemplos da solubilização do complexo bixina/ciclodextrinas. A – bixina insolúvel em água; B – α -CD solúvel em água; C – complexo α -CD/bixina solúvel em água; D – β -CD solúvel em água; E – complexo β -CD/bixina solúvel em água; F – γ -CD solúvel em água; G – complexo γ -CD/bixina solúvel em água. As amostras dos complexos mostradas nesta figura são meramente ilustrativas, não estando portanto padronizadas em relação à quantidade do complexo solubilizado.

4.3.1.1 Formação do Complexo

Vários são os métodos que podem ser utilizados para caracterizar a formação do complexo de inclusão. Neste estudo os complexos formados com a astaxantina foram estudados por métodos espectrofotométricos e cromatográficos. Tais métodos buscam evidenciar mudanças em uma das duas partes do complexo e qual a quantidade da molécula hóspede foi complexada.

A formação do complexo de inclusão mostrou ser mais eficiente quando a ciclodextrina utilizada foi a RAMEB (*random methylated β -cyclodextrin*), com um valor de absorbância do pigmento hidrossolúvel 3 vezes maior do que o valor observado com a β -CD não derivada. Entretanto, com essa ciclodextrina metilada a diferença nos valores de absorbância após sonicação foi menos visível do que nos outros casos – 10% de aumento contra 56% no caso da α -ciclodextrina. Os outros tipos de ciclodextrina utilizados no experimento também tiveram importantes aumentos nos valores de absorbância dos respectivos complexos em 470 nm: 42%,

26% e 28% para a β -CD, γ -CD e HP- β -CD (derivado hidroxi-propil), respectivamente (dados não mostrados). Com estes resultados optou-se por trabalhar apenas com a β -CD, que de todas as ciclodextrinas é a de mais fácil acesso e menor preço encontrada no mercado, apesar do resultado superior obtido com a RAMEB.

4.3.1.2 Efeito da sonicação sobre a solubilidade do complexo

Em 1927, Alfredo Loomis foi o primeiro químico a reconhecer o efeito anômalo de ondas sonoras intensas propagando-se pelo líquido. Este efeito é denominado de “efeito sonoquímico”. A partir da década de 80, a sonoquímica sofreu grande avanço e muitos trabalhos foram publicados em diferentes sistemas. Transformações químicas e físicas podem ocorrer devido à interação da radiação com a matéria. Para se ter uma idéia da frequência do ultra-som, pode-se fazer uma comparação com o ouvido humano. A sensibilidade do ouvido humano está na faixa de 16 Hz a 16 KHz; a frequência característica do ultra-som, em geral, está no intervalo de 16 KHz a 1 MHz. A ação do ultra-som é um fenômeno físico baseado no processo de criar, aumentar e implodir cavidades de vapor e gases, denominado cavitação, em um líquido promovendo então efeitos de ativação em reações químicas. Durante a etapa de compressão a pressão é positiva, enquanto que a expansão resulta em vácuo, chamado de pressão negativa, constituindo-se em um ciclo de compressão-expansão que gera as cavidades. Num líquido com partículas sólidas dispersas, os gases são adsorvidos nos poros das partículas. Durante a etapa da compressão os gases ou vapores não retornam completamente ao líquido, resultando em um aumento efetivo da cavidade. Ciclos periódicos de compressão e expansão causam aumento do tamanho da cavidade. A cavidade ao atingir um tamanho crítico implode-se, liberando grande quantidade de calor e pressão em um curto período de tempo e em pontos localizados do líquido (MARTINES *et al.*, 2000).

Em busca de resposta de como o processo sonoquímico interfere na solubilidade do complexo formado entre ciclodextrina e carotenóides, foram

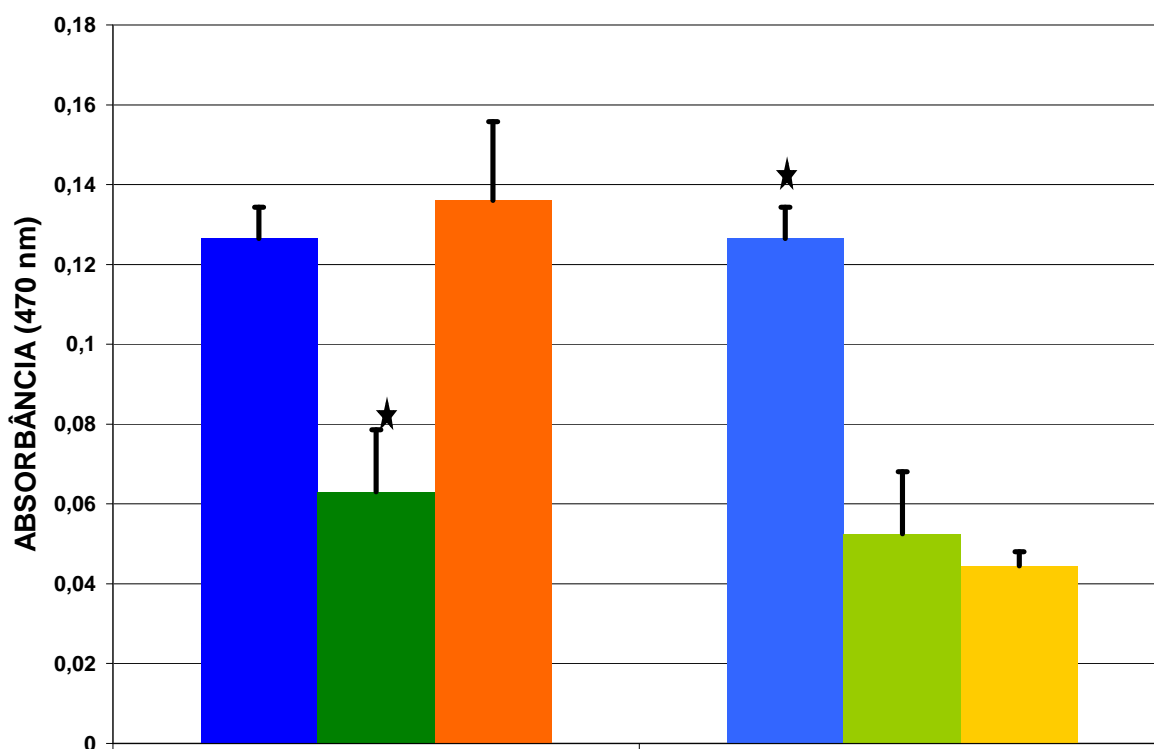
estudadas algumas formas de solubilização deste complexo. Primeiramente testou-se qual era a influência da ordem em que os processos de centrifugação e sonicação ocorriam, e se este critério era o mesmo para os dois carotenóides complexados: astaxantina (figura 38) e bixina (figura 39).

As amostras da β -ciclodextrina em solução aquosa (controle do experimento) e do complexo formado entre esta substância e a astaxantina também em solução aquosa foram divididas em três alíquotas e submetidas a diferentes processos: a) uma simples centrifugação da solução; b) um ciclo de 30 segundos de sonicação em banho de gelo antes da centrifugação da amostra e c) o mesmo que foi feito no processo “b”, só que com a sonicação realizada após a centrifugação das amostras. Pode-se perceber que quando se utilizou a solução de β -ciclodextrina apenas centrifugada como controle para a leitura dos valores de absorbância das soluções aquosas do complexo β -ciclodextrina/astaxantina, o único tratamento dado ao complexo que foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) foi o que consistia na centrifugação do complexo antes do processo de sonicação (figura 38). Esta amostra foi cerca de 2 vezes menos solúvel do que as alíquotas que foram submetidas aos outros processos estudados. Não foram encontradas diferenças significativas na solubilidade da amostra do complexo apenas centrifugado com a do complexo que fora primeiramente sonicado e depois centrifugado. Este fato leva a crer que sob essas condições, o processo de sonicação realizado após a centrifugação do complexo é uma boa forma de solubilização.

Por outro lado, quando a absorbância das amostras dos complexos submetidos a diferentes meios de solubilização (centrifugação, centrifugação seguida de sonicação ou centrifugação realizada após a sonicação) utilizando como controle do experimento a solução aquosa de β -ciclodextrina submetida às mesmas técnicas de solubilização, observou-se que a única amostra do complexo astaxantina/ β -ciclodextrina que pode ser considerada estatisticamente diferente das demais foi aquela que foi tratada apenas com centrifugação e comparada com a β -

ciclodextrina também apenas centrifugada. Esta amostra se mostrou cerca de 2,5 vezes mais eficiente em promover a solubilização do complexo do que as demais amostras. A alíquota do complexo que foi centrifugada antes de ser sonicada (controle com solução de β -ciclodextrina também centrifugada antes da sonicação) e a amostra que foi primeiramente sonicada para depois ser centrifugada (utilizando como controle a solução de β -ciclodextrina que passou pelo mesmo procedimento), não apresentaram diferenças.

FIGURA 38 – EFEITO DA SONICAÇÃO DA CICLODEXTRINA NA SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM ASTAXANTINA

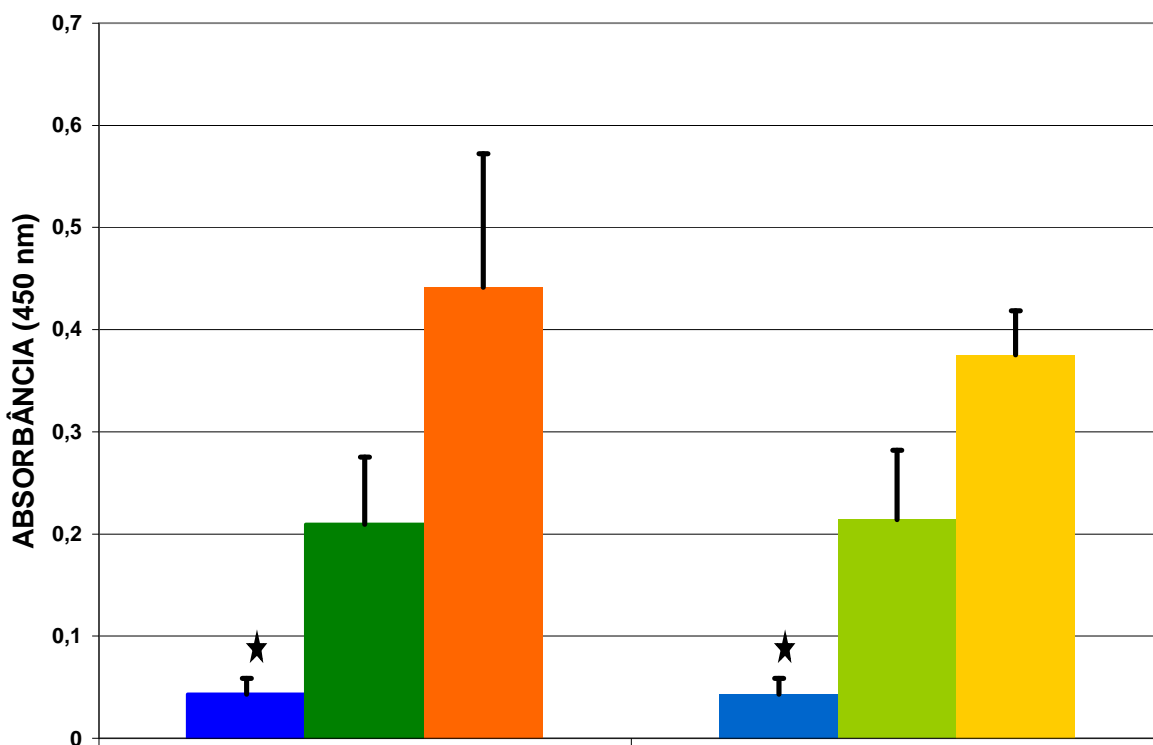


Foram lidas as absorbâncias de soluções aquosas do complexo astaxantina/ β -ciclodextrina (5 mg/ml) em diferentes situações. As barras cheias referem-se às amostras do complexo que foram submetidas apenas à centrifugação (barra azul), à centrifugação e posterior sonicação (barra verde) e ao processo de sonicação realizado antes da centrifugação (barra amarela). Estas amostras utilizaram como controle a solução de β -ciclodextrina apenas centrifugada. As barras claras representam as amostras do complexo que foram centrifugadas e comparadas com a solução de β -ciclodextrina também apenas centrifugada (barra azul); a amostra que foi centrifugada e depois sonicada comparada com a β -ciclodextrina também centrifugada e depois sonicada (barra verde) e a amostra do complexo que foi sonicada antes de ser centrifugada e comparada com a β -ciclodextrina que passou pelo mesmo processo (barra amarela). Os processos de centrifugação e sonicação foram realizados de acordo com o item 3.2.3.1.2. de Material e Métodos.

★ Amostras estatisticamente diferentes. Os valores representados são a média \pm desvio-padrão de 3 experimentos independentes.

Na figura 39 podem ser observadas os resultados encontrados quando se realizou o mesmo experimento utilizando a bixina como carotenóide de eleição para a complexação com a β -ciclodextrina.

FIGURA 39 – EFEITO DA SONICAÇÃO DA CICLODEXTRINA NA SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO COM BIXINA



Foram lidas as absorbâncias de soluções aquosas do complexo bixina/ β -ciclodextrina (5 mg/ml) em diferentes situações. As barras cheias referem-se às amostras do complexo que foram submetidas apenas à centrifugação (barra azul), à centrifugação e posterior sonicação (barra verde) e ao processo de sonicação realizado antes da centrifugação (barra amarela). Estas amostras utilizaram como controle a solução de β -ciclodextrina apenas centrifugada. As barras claras representam as amostras do complexo que foram centrifugadas e comparadas com a solução de β -ciclodextrina também apenas centrifugada (barra azul); a amostra que foi centrifugada e depois sonicada comparada com a β -ciclodextrina também centrifugada e depois sonicada (barra verde) e a amostra do complexo que foi sonicada antes de ser centrifugada e comparada com a β -ciclodextrina que passou pelo mesmo processo (barra amarela). Os processos de centrifugação e sonicação foram realizados de acordo com o item 3.2.3.1.2. de Material e Métodos.

★ amostras estatisticamente diferentes. Os valores representados são a média \pm desvio-padrão de 3 experimentos independentes.

Torna-se evidente que o fato de se usar a solução aquosa da ciclodextrina como controle dos experimentos somente centrifugada ou submetida aos mesmos tratamentos dados ao complexo β -ciclodextrina/bixina, não alterou o perfil da

solubilidade dos complexos formados. Ou seja, em todos os casos estudados (solução de β -ciclodextrina aquosa utilizada como controle apenas centrifugada ou submetida aos mesmos processos das amostras do complexo), as alíquotas da solução contendo o complexo que foram sonicadas, foram mais eficientes do que aquelas que passaram por uma simples centrifugação. Mesmo que a sonicação ocorra após a centrifugação do complexo, ainda observa-se um aumento de até 15 vezes nos valores de absorbância da amostra que foi apenas centrifugada.

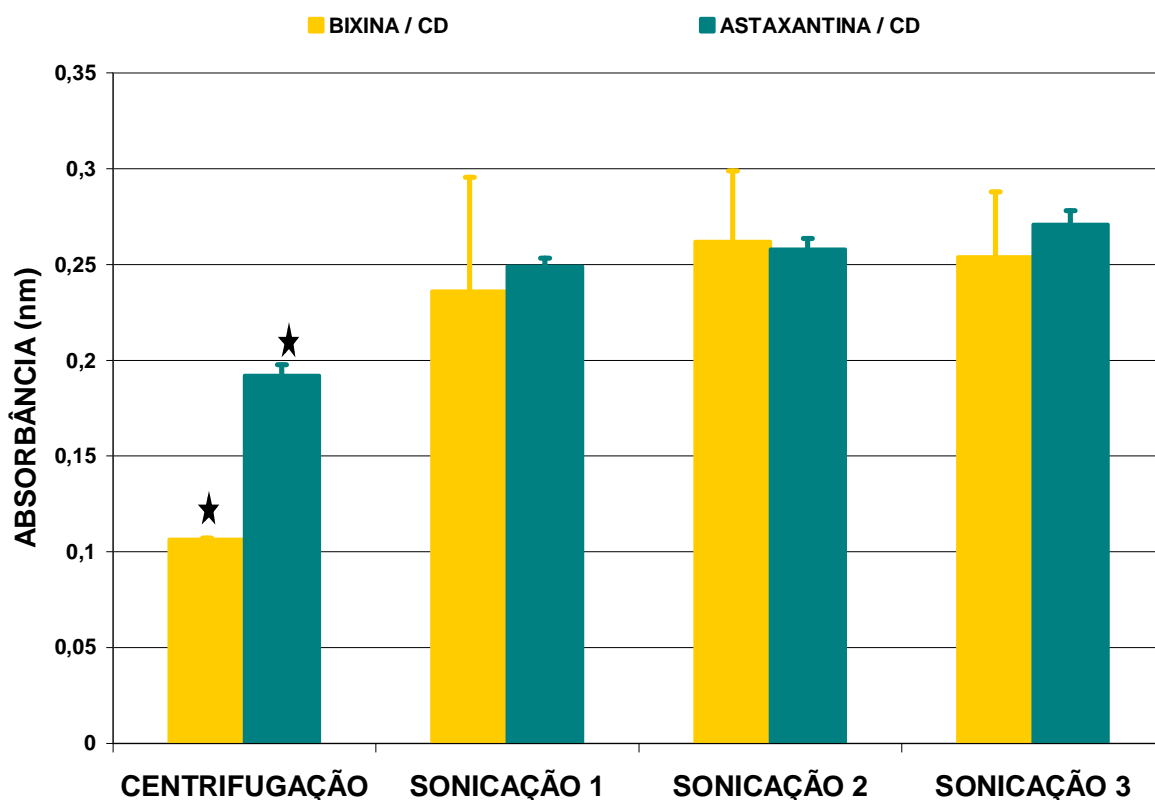
Uma vez que o processo sonoquímico parece não ter relação com a ciclodextrina isoladamente (as soluções aquosas de β -ciclodextrina que foram sonicadas e utilizadas como controle dos experimentos mostraram valores de absorbância das soluções aquosas dos complexos iguais ou menores do que os valores obtidos quando as soluções de β -ciclodextrina foram apenas centrifugadas), pode-se supor que a quantidade de bixina complexada com a ciclodextrina durante a formação do complexo tenha sido maior do que a de astaxantina. Assim, nas amostras do complexo bixina/ β -ciclodextrina, é possível que as moléculas de ciclodextrina presentes na solução do complexo apenas centrifugado fossem capazes de complexar um número maior de moléculas de bixina. A sonicação deste complexo parece ter causado um aumento na quantidade de moléculas de bixina complexadas com a ciclodextrina que se encontrava ainda livre na solução, refletido pelo aumento na solubilidade (por flexibilização do tamanho da cavidade da ciclodextrina ou pela mais eficiente expulsão da água que ocupa este espaço quando a ciclodextrina não está complexada). Na situação do complexo astaxantina/ciclodextrina, provavelmente o número de moléculas de carotenóide ou de ciclodextrina estavam mais perto de uma relação estequiométrica, justificando desta maneira o pequeno aumento nos valores de absorbância. A hipótese de que a sonicação estaria liberando a astaxantina do complexo fica descartada, pois nestas condições, o carotenóide perder-se-ia na lâmina flutuante da centrifugação.

Para uma melhor compreensão do processo de complexação comparativa

cabe lembrar que as cadeias de hidrocarboneto dos dois carotenóides ensaiados exibem uma diferença fundamental: na astaxantina estão, nas extremidades duas cabeças cíclicas, o que deve potencializar o respectivo processo de complexação.

O processo sonoquímico realizado na solução aquosa do complexo carotenóide/ β -ciclodextrina se mostrou importante para a maior solubilização da amostra. O questionamento a ser feito agora, é se um único ciclo de sonicação é suficiente para alcançar o efeito desejado ou se são necessários ciclos adicionais de sonicação. Os resultados deste experimento estão evidenciados na figura 40.

FIGURA 40 – EFEITO DA QUANTIDADE DE CICLOS DE SONICAÇÃO NA SOLUBILIDADE DOS COMPLEXO DE INCLUSÃO ENTRE β -CD E CAROTENÓIDES



Foram estudadas as amostras do complexo carotenóide/CD tratadas de 4 formas diferentes antes de terem suas absorbâncias lidas em espectrofotômetro: a centrifugação apenas, a centrifugação seguida de sonicação por 30s (sonicação 1), centrifugação seguida por 2 ciclos de sonicação (sonicação 2) e centrifugação seguida por 3 ciclos de sonicação (sonicação 3). Os processos de centrifugação e sonicação foram realizados de acordo com o item 3.2.3.1.2. de Material e Métodos.

★ amostras estatisticamente diferentes. Os valores representados são a média \pm desvio-padrão de 3 experimentos independentes.

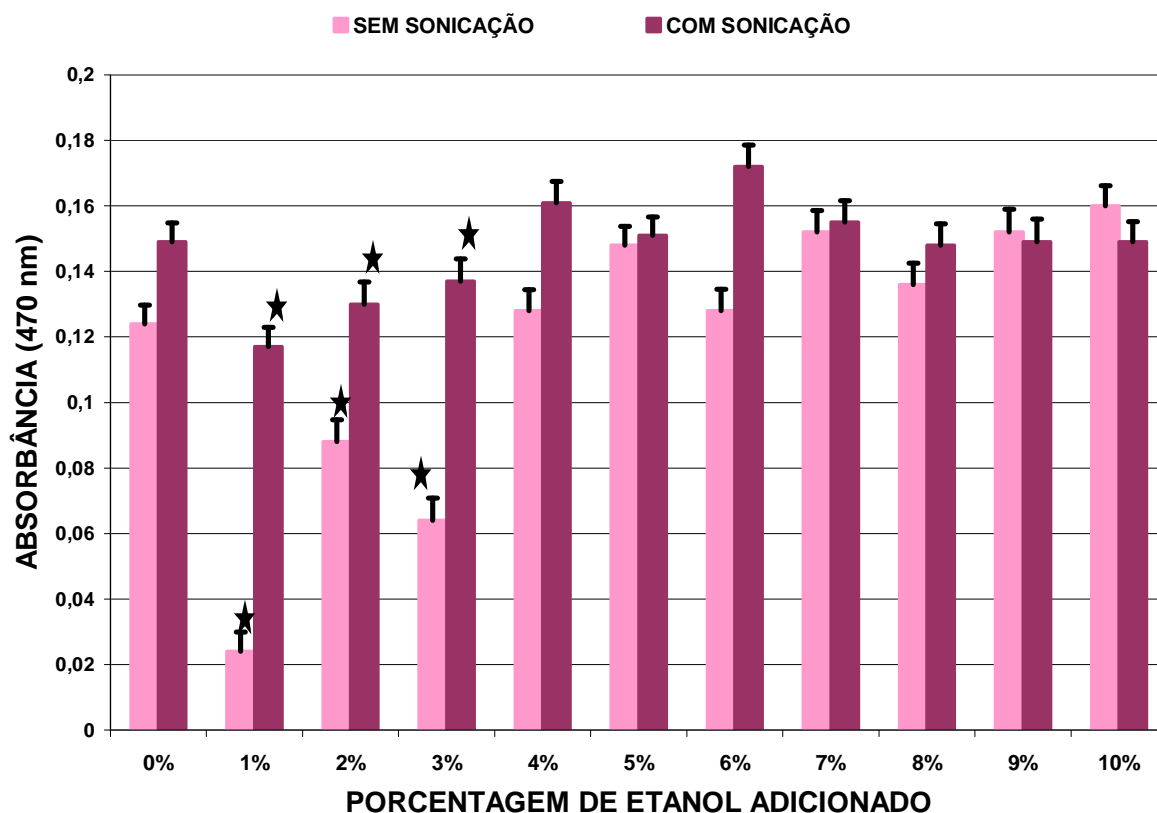
Verifica-se que as amostras dos complexos estudados (bixina/ β -ciclodextrina e astaxantina/ β -ciclodextrina) possuem diferenças estatisticamente significativas na sua solubilidade em relação ao número de ciclos de sonicação realizados. Com base nos resultados obtidos neste experimento, pode-se afirmar que o fato da amostra complexada com ciclodextrina passar apenas por uma etapa de centrifugação para a retirada do sobrenadante (pigmento hidrossolúvel) é estatisticamente diferente dos outros tratamentos estudados ($p < 0,05$). Isto significa dizer que um único ciclo de sonicação é suficiente para provocar o aumento observado na absorbância dos complexos formados (146% e 41% para os complexos com bixina e astaxantina, respectivamente). Os demais ciclos de sonicação realizados são desnecessários, pois não provocaram nenhum aumento adicional da solubilidade dos complexos estudados.

Levando-se em conta as observações deste experimento, foi adotado como procedimento padrão para os experimentos seguintes o uso de apenas 1 ciclo de sonicação para a solubilização dos complexos formados.

4.3.1.3 Efeito da adição de etanol sobre a solubilidade do complexo

O etanol pode ser considerado como o solvente orgânico mais amplamente utilizado, senão o único admissível para produtos alimentares (bebidas) e farmacêuticos (alcoólatos), e aquele que provoca menores efeitos toxicológicos. Tendo em vista que a possível utilização dos complexos hidrossolúveis formados com ciclodextrinas e carotenóides na indústria de alimentos poderia ser uma alternativa bastante interessante para a substituição de outros tipos de corantes que são adicionados ao alimento ou bebida, os quais muitas vezes são nocivos à saúde, testou-se o efeito da adição de etanol ao complexo já solubilizado. Foram testados valores de 0% a 10% de etanol (valores estes comuns na prática industrial), com o objetivo de verificar se ocorria alteração da solubilidade dos complexos (figura 41).

FIGURA 41 – EFEITO DA ADIÇÃO DE ETANOL NA SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS ENTRE ASTAXANTINA E β -CICLODEXTRINA



Foram estudadas as amostras dos complexos de astaxantina e β -CD (5 mg/ml) em solução aquosa após a adição etanol aos mesmos (1% a 10%). Os processos de centrifugação e sonicação foram realizados de acordo com o item 3.2.3.1.2. de Material e Métodos.

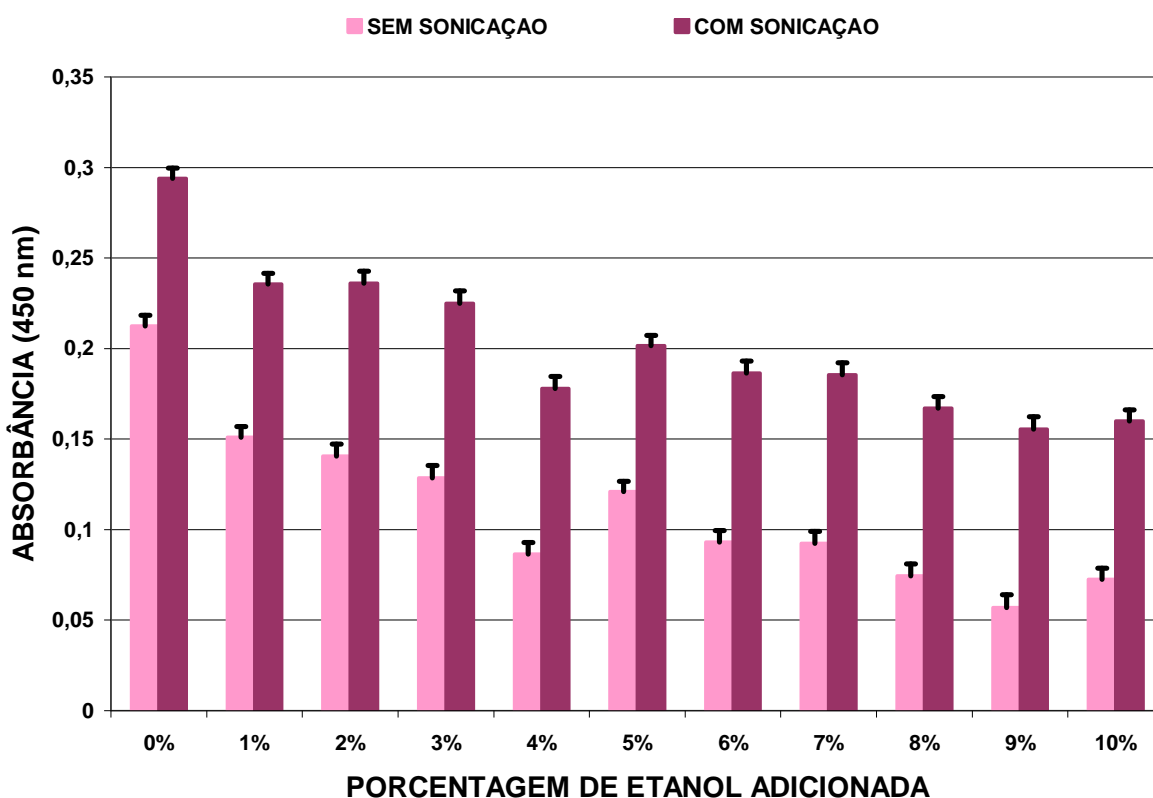
★ amostras estatisticamente diferentes. Os valores representados são a média \pm desvio-padrão de 3 experimentos independentes.

A adição de etanol nas amostras dos complexos de ciclodextrina e astaxantina não exerce influência significativa no aumento da solubilidade do mesmo, visto que nas concentrações acima de 5% de etanol sem sonicação os valores da absorbância das soluções foram iguais ao da solução do complexo que não teve o etanol adicionado, com exceção das amostras situadas na faixa de 1% a 3% de etanol. Estas amostras apresentaram uma diminuição significativa dos valores de absorbância obtidos. O processo sonoquímico realizado foi capaz de elevar a solubilidade das amostras adicionadas de etanol até a faixa de 6% (porcentagem de etanol). Após esta concentração, a sonicação das amostras não mais alterou os valores de absorbância encontrados. Este fato mostra-se bastante

interessante, pois facilitaria a sua utilização tanto na indústria de alimentos quanto na de bebidas e cosméticos, uma vez que a presença do etanol em porcentagens iguais ou maiores que 5% não reduz a solubilidade dos complexos de inclusão do pigmento astaxantina.

Já em relação ao complexo bixina/ciclodextrina pode-se notar que a melhor alternativa para a sua solubilidade é a não adição do etanol (figura 42). Em todas as concentrações do solvente utilizadas foram atestadas diminuições nos valores de absorbância.

FIGURA 42 – EFEITO DA ADIÇÃO DE ETANOL NA SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS ENTRE BIXINA E β -CICLODEXTRINA



Foram estudadas as amostras dos complexos de bixina e β -CD (5 mg/ml) em solução aquosa após a adição etanol aos mesmos (1% a 10%). Os processos de centrifugação e sonicação foram realizados de acordo com o item 3.2.3.1.2. de Material e Métodos. Os valores representados são a média \pm desvio-padrão de 3 experimentos independentes.

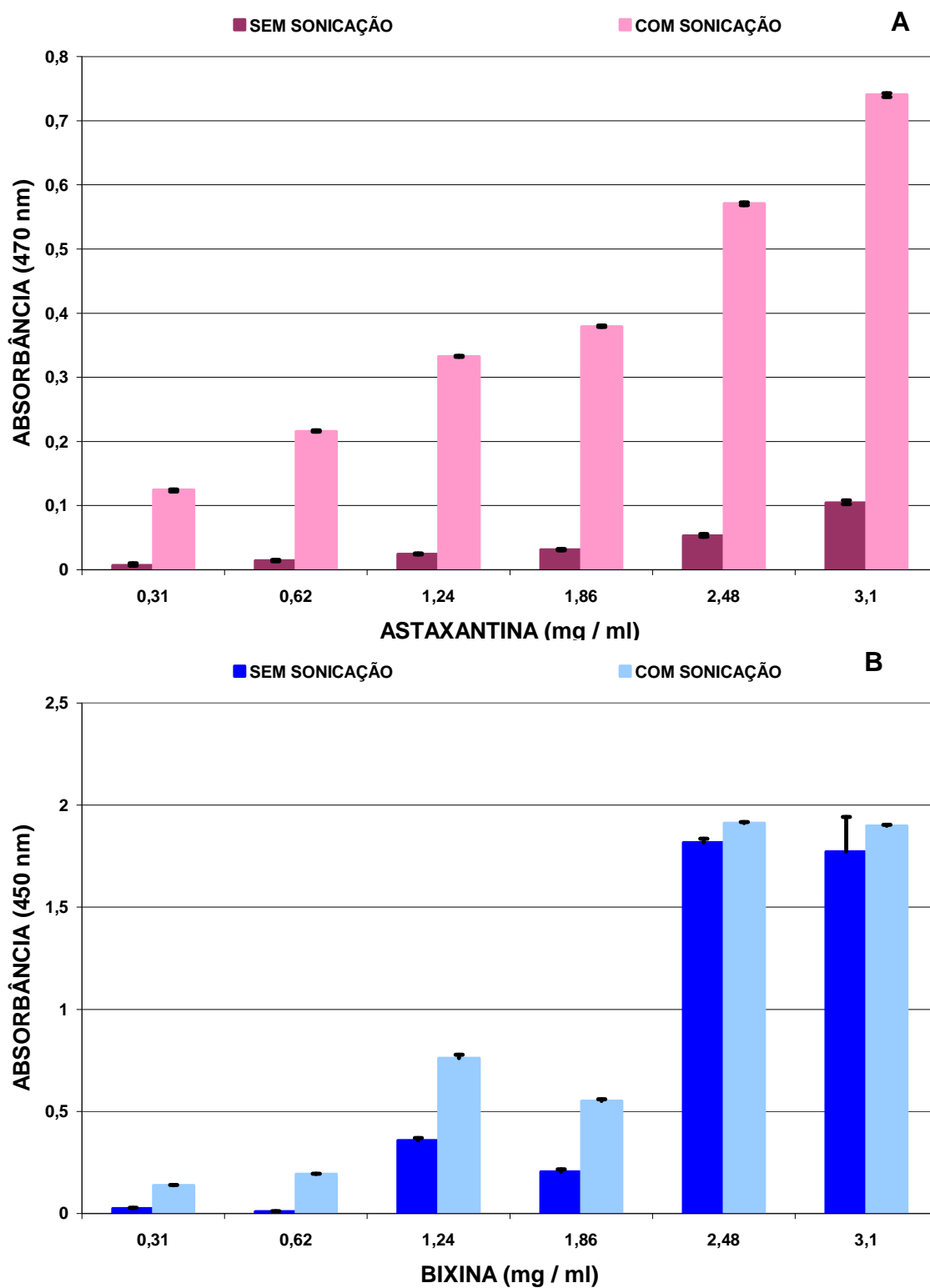
Nas concentrações entre 1% e 3% houve uma diminuição de cerca de 30% na solubilidade do complexo; entre 4% e 8% esta diminuição foi de aproximadamente 55% e acima de 9% de etanol esta taxa chega perto dos 70%. Mesmo as amostras que foram sonicadas apresentaram valores de absorbância menores do que o obtido para a amostra controle (sem adição de etanol e sonicada). Porém, pode-se observar que houve um aumento na solubilidade das soluções aquosas do complexo β -ciclodextrina/bixina adicionadas de etanol e sonicadas quando comparadas com aquelas amostras que, apesar de terem sofrido a adição do etanol, não foram submetidas ao processo de sonicação.

4.3.1.4 Efeito da re-adição de carotenóide sobre a solubilidade do complexo

Após a verificação no experimento anterior de que não se faz necessário a adição etanol para uma melhor solubilização do complexo carotenóide/ β -CD, testou-se a adição de quantidades extras de carotenóide ao complexo já formado (figura 43 A e B). Observa-se que a adição de qualquer quantidade de carotenóide provoca uma elevação na solubilidade do complexo tanto com a astaxantina quanto com a bixina.

No caso da astaxantina, este aumento chega a ser de cerca de 10 vezes quando a amostra não está sonicada. Este aumento vai ocorrendo de forma gradual, até que na última concentração utilizada, a diferença na solubilidade chega a ser de apenas 1,5 vez. O processo de sonicação ainda é capaz de favorecer a complexação entre a astaxantina e a β -ciclodextrina, de forma que o aumento na solubilidade do complexo passa a ser de aproximadamente 7,5 vezes. Isto pode indicar que ainda existiam moléculas de β -ciclodextrina livres no complexo, que foram capazes de complexar quantidades maiores de astaxantina.

FIGURA 43 - EFEITO DA RE-ADIÇÃO DO CAROTENÓIDE AO COMPLEXO PREVIAMENTE FORMADO ENTRE CD E ASTAXANTINA (A) OU CD E BIXINA (B)



Estudo do efeito da adição suplementar de astaxantina (A) e bixina (B) em solução de acetona (até cerca de 3 mg/ml) na solubilidade do complexo formado (soluções aquosas com 5 mg/ml). Os valores representados são a média \pm desvio-padrão de 3 experimentos independentes.

Entretanto, no caso do complexo bixina/ β -ciclodextrina, este aumento na solubilidade ocorre até a adição de 2,5 mg/ml (cerca de 18 vezes). A partir desta concentração, quantidades extras do carotenóide não são mais utilizadas, mostrando uma condição de saturação do complexo e indicando um equilíbrio entre moléculas hóspedes e hospedeiras. Pode-se suspeitar que no complexo formado anteriormente havia ainda uma certa quantidade disponível de ciclodextrina para ter sua cavidade ocupada pela molécula de carotenóide. Quando esta quantidade esgotou-se, não houve mais aumento da solubilidade do complexo, mesmo com a aplicação de sonicação.

4.3.1.5 Efeito da re-adição de ciclodextrina sobre a solubilidade do complexo

Para que fosse possível afirmar que ainda havia moléculas de ciclodextrinas livres no meio reacional contendo o complexo já formado, foi necessário estudar também o efeito da re-adição desta substância ao complexo. Quantidades crescentes de ciclodextrina foram adicionadas à solução formada pelo complexo carotenóide/ciclodextrina (5 mg/ml) e após nova centrifugação e sonicação as alíquotas separadas tiveram suas absorbâncias lidas novamente. Como era esperado, não houve alteração nos valores de absorbância quando as amostras foram adicionadas de mais ciclodextrina (dados não mostrados).

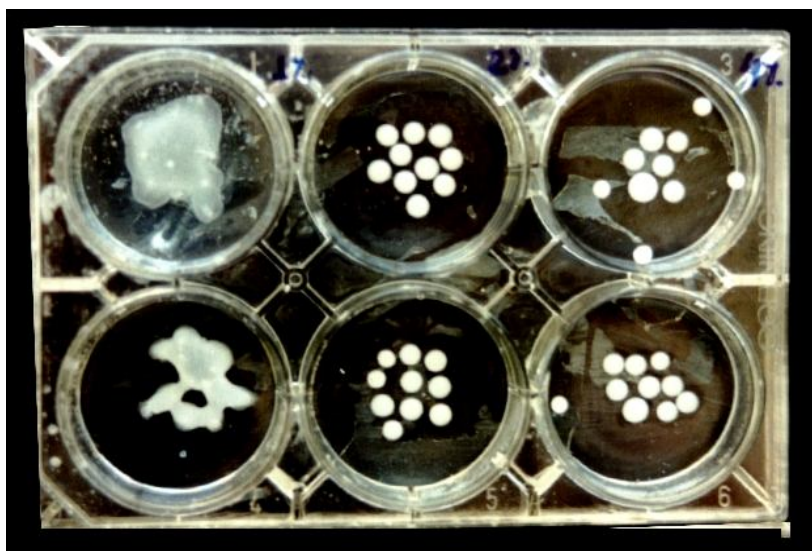
4.3.2 Complexação com Quitosana

4.3.2.1 Formação das esférulas de quitosana

A formação das esférulas (figura 44) se mostrou possível em solução aniônica de pirofosfato de sódio, quando se utilizou concentração do ânion maior que 2%. Abaixo dessa concentração, a quitosana formou um aglomerado único, no qual não se pode distinguir a formação de esférulas. Com o aumento das concentrações

utilizadas pode-se notar uma melhor forma nas esférulas formadas, bem como maior resistência destas a manipulação.

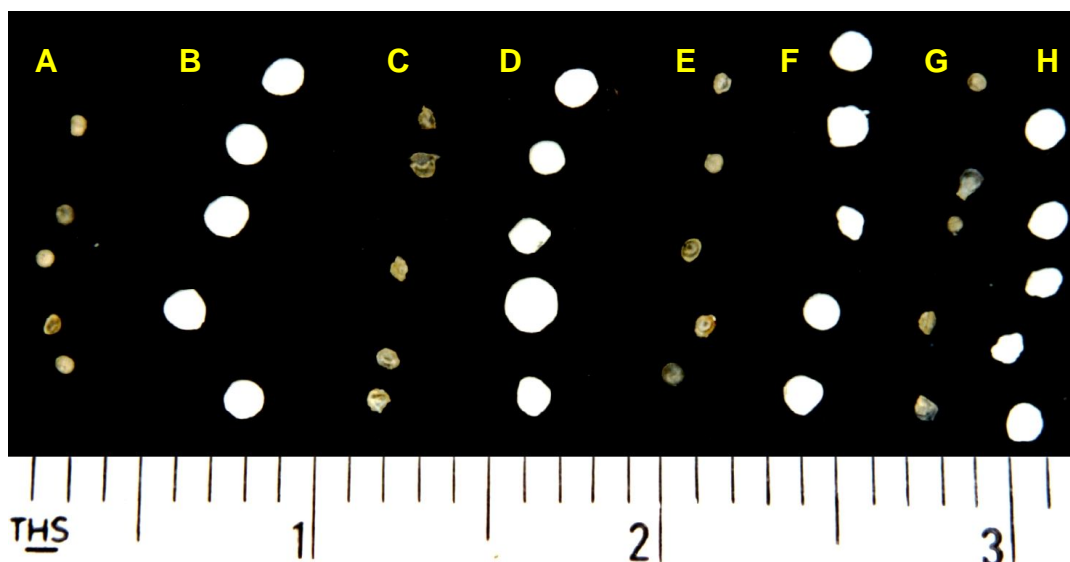
FIGURA 44 - FORMAÇÃO DE ESFÉRULAS DE QUITOSANA



Nos poços superiores da figura estão mostrados os resultados obtidos após 1 hora do gotejamento da solução aquosa de quitosana (em ácido acético a 1%) sobre a solução aniônica a zero, 2 e 4%. A parte inferior da figura contém as mesmas amostras, só que decorridas 4 horas do experimento.

Após os tempos já mencionados, as esférulas de quitosana (em solução de ácido acético a 1%) obtidas foram retiradas das soluções onde permaneciam e submetidas a dois modos diferentes de secagem: exposição ao ar livre e / ou liofilização para posterior comparação das características morfológicas obtidas com cada tratamento (figura 45). Com a realização deste experimento, tornaram-se bastante claras as diferenças drásticas encontradas visualmente na formação das esférulas de quitosana sem adição do pigmento. As amostras que foram secas ao ar livre possuíam uma coloração amarelada e eram mais translúcidas, ao passo que aquelas que foram liofilizadas possuíam características mais condizentes com o termo “esfera”. Elas eram também maiores e de coloração branca e opaca.

FIGURA 45 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MEIOS DE SECAGEM DAS ESFÉRULAS DE QUITOSANA



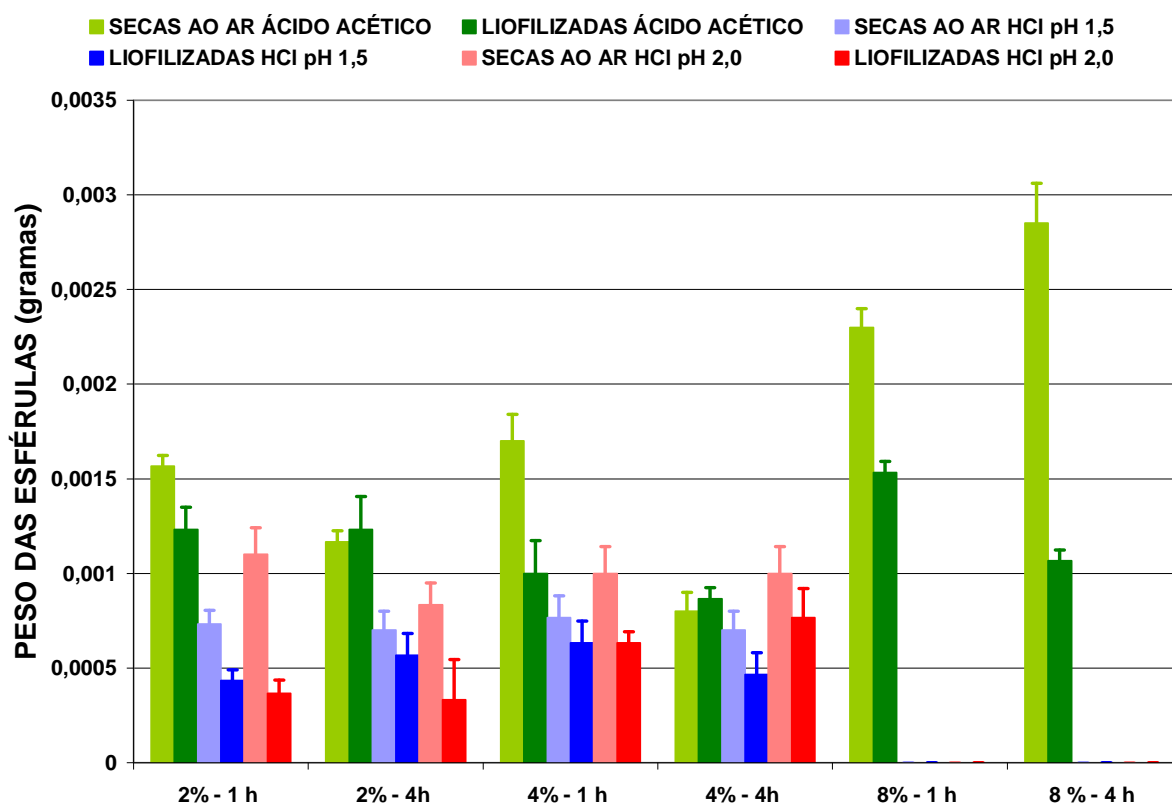
As linhas representadas pelas letras em destaque na fotografia representam as seguintes situações: A = ar livre + 1 hora + solução aniônica a 2%; B = liofilização + 1 hora + solução aniônica a 2%; C = ar livre + 4 horas + solução aniônica a 2%; D = liofilização + 4 horas + solução aniônica a 2%; E = ar livre + 1 hora + solução aniônica a 4%; F = liofilização + 1 hora + solução aniônica a 4%; G = ar livre + 4 horas + solução aniônica a 4% e H = liofilização + 4 horas + solução aniônica a 4%.

Realizou-se também a pesagem e a medida do diâmetro das esferas formadas em todas as condições testadas. Avaliou-se o efeito do ácido que estava solubilizando a quitosana e do método de secagem utilizado em relação ao tamanho e peso das esférulas obtidas e os resultados podem ser evidenciados nas figuras 46 e 47.

Quando o peso das esférulas formadas e secas ao ar livre foi analisado, pode-se observar que a condição de 8% de solução de pirofosfato de sódio foi a que permitiu a formação de esférulas mais pesadas quando se utilizou como solvente para a quitosana o ácido acético a 1%. Nos outros solventes testados, nestas condições não houve a formação de esférulas. O fator tempo parece ter influência no peso das esférulas quando elas são formadas utilizando o ácido acético. Nas condições de 2% e 4% de pirofosfato de sódio as esférulas formadas foram mais pesadas quando expostas a esta solução por apenas 1h ($p < 0,05$). Entretanto,

quando o pirofosfato estava em 8%, as esférulas formadas tiveram um peso maior quando ficaram expostas por mais tempo (4h). Quando o solvente da quitosana foi o HCl pH 1,5 ou 2 não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o teor do pirofosfato e nem do tempo de permanência das esférulas nestas soluções. Fica bastante evidente também que a liofilização produziu esférulas mais leves em todas as situações estudadas.

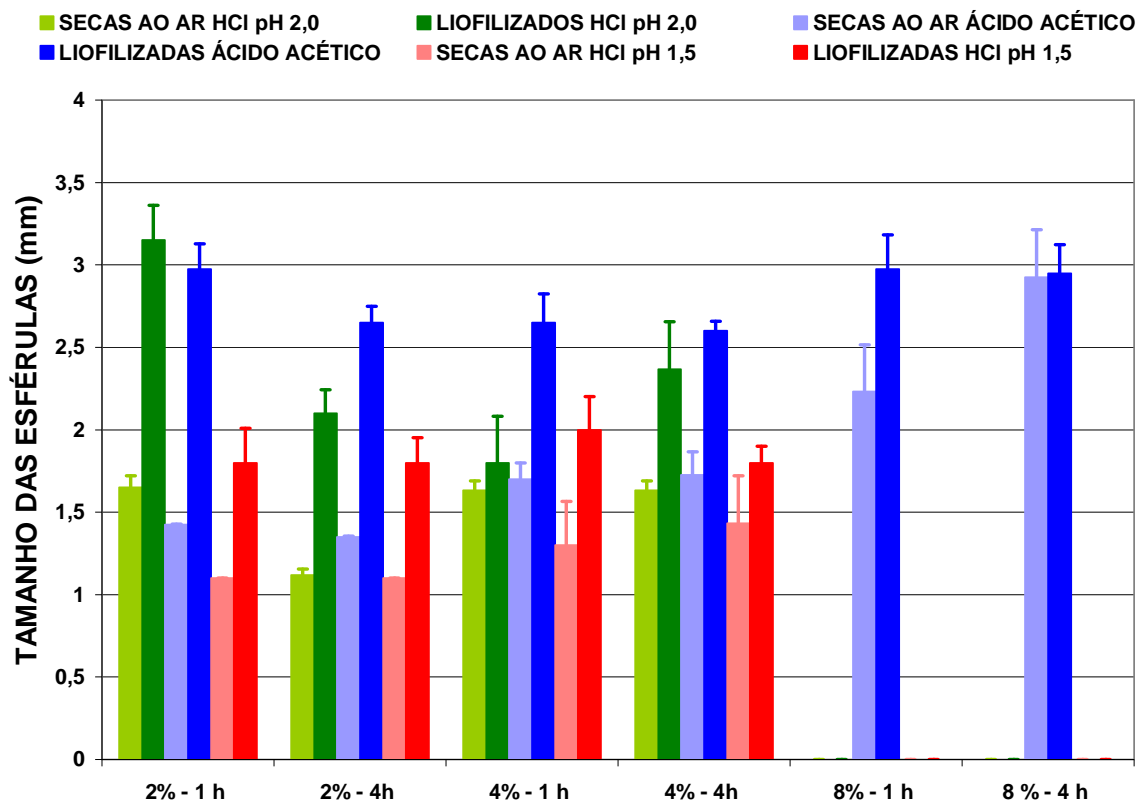
FIGURA 46 – COMPARAÇÃO DO PESO DAS ESFÉRULAS DE QUITOSANA EM FUNÇÃO DA PORCENTAGEM DA PIROFOSFATO, DO TEMPO E DAS CONDIÇÕES DE SECAGEM



Foram estudados os solventes utilizados para a solubilização da quitosana (ácido acético 1%); HCl pH 1,5 e pH 2), o tempo de permanência em solução de pirofosfato de sódio das esférulas (1h ou 4h) e a porcentagem de ânion nesta solução (1% a 8%). Os dados representam a média \pm desvio-padrão da medida do peso de 5 esférulas obtidas nas condições especificadas.

A análise do tamanho das esférulas de quitosana formadas (figura 47) permite a verificação de que sempre que o ácido acético foi utilizado como solvente para a quitosana, formaram-se esférulas maiores.

FIGURA 47 – COMPARAÇÃO DO TAMANHO DAS ESFÉRULAS DE QUITOSANA EM FUNÇÃO DA PORCENTAGEM DA PIROFOSFATO, DO TEMPO E DAS CONDIÇÕES DE SECAGEM



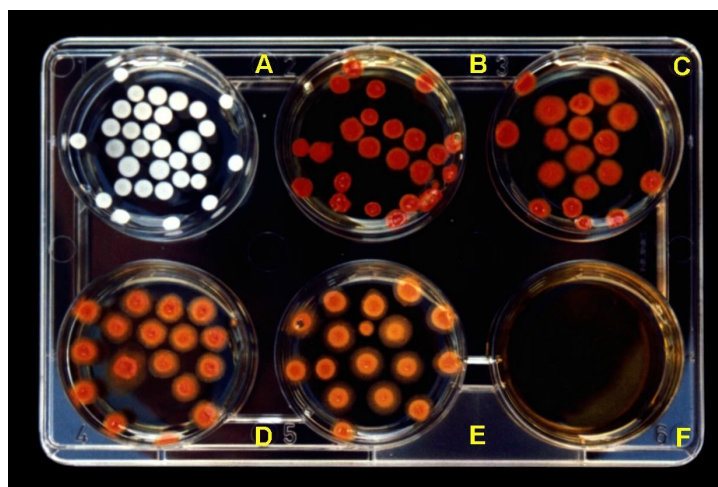
Foram estudados os solventes utilizados para a solubilização da quitosana (ácido acético 1%); HCl pH 1,5 e pH 2), o tempo de permanência em solução de pirofosfato de sódio das esférulas (1h ou 4h) e a porcentagem de ânion nesta solução (1% a 8%). Os dados representam a média \pm desvio-padrão da medida do peso de 5 esférulas obtidas nas condições especificadas.

As condições testadas mostraram que a presença de 1% de ânion na solução formadora de esférulas de quitosana não surtiu o efeito desejado, já que não houve formação de esférulas (dados não mostrados). Nos demais casos, nota-se que sempre que se utilizou o ácido acético como solvente da quitosana as esférulas formadas foram maiores. Na faixa de concentração de 2% a 4% de ânion na solução apareceram diferenças, mas que quando comparadas aos resultados obtidos com os dados referentes à presença de 8% de ânion na solução acabam mostrando-se menos evidentes. Quando se utilizou o HCl nos pH de 1,5 e 2,0 na presença de 8% de solução aniônica não foram formadas as esférulas. Também pode ser percebido que o processo de liofilização permitiu a formação de esférulas maiores.

A quitosana, um polícatión em pH ácidos, é um adsorvente de corantes, especificamente corantes reativos como o RR 123 e RY 145. Os grupos protonados dos radicais amino da quitosana podem agir como sítios catiônicos para os corantes aniônicos. Medidas do equilíbrio da adsorção dos corantes C.I. laranja ácido 7, C.I. vermelho ácido 13 e 27 mostraram uma estequiometria de 1:1 na interação entre os grupos sulfônicos ácidos dos corantes com os grupos amino protonados da quitosana. A ligação de corantes à quitosana é de particular importância na coloração de fibras têxteis tratadas com quitosana e no seu uso como potenciais carreadores para aditivos alimentares (MUZZARELLI, 1998).

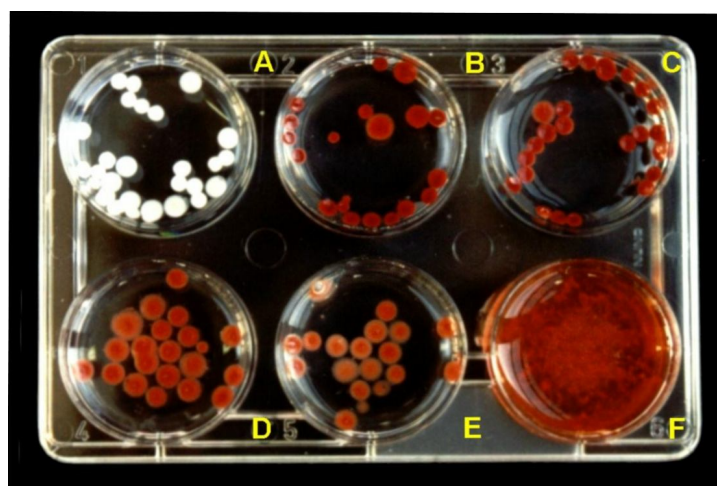
Após estas tentativas de estabelecimento de uma condição ideal de formação de esferas, testou-se a formação destas com a adição de bixina e/ou astaxantina à solução de quitosana. Optou-se por utilizar como condição básica o uso de quitosana dissolvida em ácido acético 1% e uma solução com 8% de concentração de ânions por ser esta a condição que apresentou os melhores resultados na formação de esférulas de quitosana sem o carotenóide. As fotografias mostradas nas figuras 48 e 49 representam fielmente a possibilidade de se obter esférulas de quitosana complexadas com carotenóides. Pode-se observar que a complexação da quitosana com o carotenóide realmente acontece, pois o gotejamento das soluções de quitosana complexadas com estes compostos possibilitou a formação de esférulas coloridas. Quando a bixina foi gotejada sozinha na solução aniônica, não houve a formação de esférulas. É possível notar que as amostras mais concentradas foram as que mais se assemelharam às esferas obtidas apenas com a quitosana, no que diz respeito à forma. À medida que a diluição das amostras aumenta, nota-se uma certa instabilidade da solução aniônica em manter a forma esférica das gotas nela despejadas.

FIGURA 48 – FORMAÇÃO DE ESFÉRULAS DE QUITOSANA COMPLEXADAS COM BIXINA



A figura acima mostra a formação de esférulas de quitosana complexadas com bixina (ácido acético 1% como solvente) em solução aniônica de pirofosfato de sódio a 8% após 1 hora de permanência da amostra gotejada neste meio. Foram ensaiadas diferentes diluições em ácido acético 1% do complexo bixina/quitosana (B = sem diluição; C = diluição de 2x; D = diluição de 4x e E = diluição de 8x). O poço da placa representado pela letra A mostra as esferas de quitosana sem a presença do carotenóide (controle positivo) e o poço destacado pela letra F representa a amostra da bixina sem a presença da quitosana (controle negativo).

FIGURA 49 – FORMAÇÃO DE ESFÉRULAS DE QUITOSANA COMPLEXADAS COM ASTAXANTINA



A figura acima mostra a formação de esférulas de quitosana complexadas com bixina (ácido acético 1% como solvente) em solução aniônica de pirofosfato de sódio a 8% após 1 hora de permanência da amostra gotejada neste meio. Foram ensaiadas diferentes diluições em ácido acético 1% do complexo bixina / quitosana (B = sem diluição; C = diluição de 2x; D = diluição de 4x e E = diluição de 8x). O poço da placa representado pela letra A mostra as esferas de quitosana sem a presença do carotenóide (controle positivo) e o poço destacado pela letra F representa a amostra da astaxantina sem a presença da quitosana (controle negativo).

Tal tipo de formulação mostrado aqui pode vir a ser de extrema utilidade na indústria de alimentos, principalmente para aquela que cuida de alimentos dietéticos. Há muito já se é conhecido o efeito agregador de gorduras exercido pela quitosana, mas ter em mãos a possibilidade de um alimento que concilie o efeito emagrecedor com um alto teor de antioxidantes (como é o caso dos carotenóides) e, que ainda por cima estimule o seu consumo pelo aspecto visual é algo de grande valia.

4.4 MODIFICAÇÃO DE CAROTENÓIDES POR MEIOS ENZIMÁTICOS

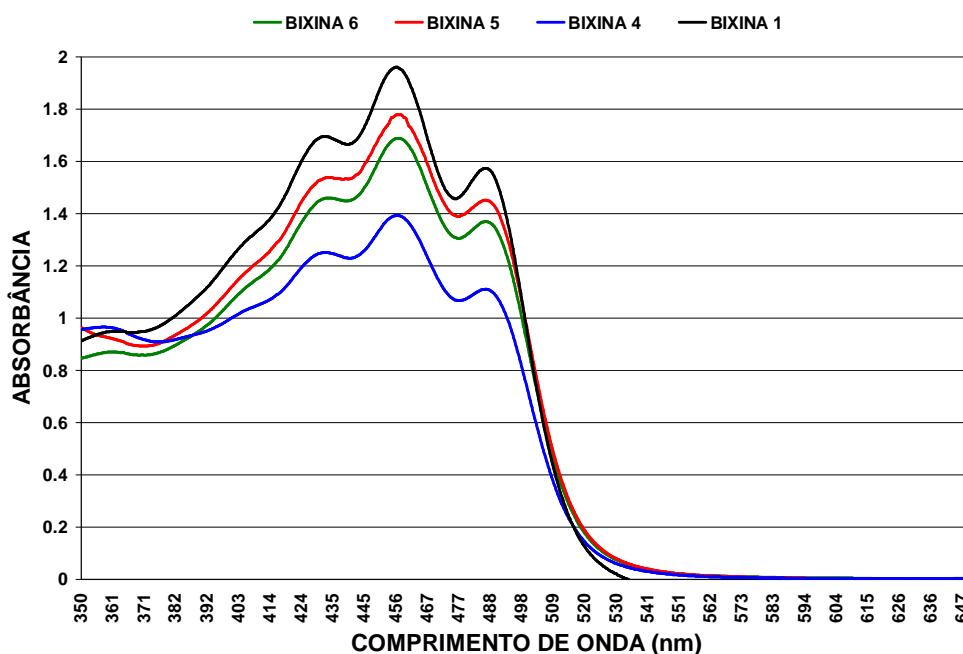
4.4.1 Esterificação dos Carotenóides pela Ação de Lipases

No estudo realizado por HUMEAU *et al.* (2000), na união covalente de caroteno com vitamina C, por via enzimática em fase reversa usando a bixina como substrato, pode ser observada a produção de três compostos coloridos. As duas substâncias mais apolares foram detectadas com valores de R_f de 0,80 e 0,86 e foram identificadas como sendo a *cis*-norbixin e a *trans*-norbixina, respectivamente. Este resultado indicava que a bixina havia sido parcialmente hidrolisada (demetilada) devido à pequena atividade hidrolítica da enzima. O terceiro produto possuía uma polaridade média (R_f de 0,36) e estava ligado ao ácido ascórbico. Ele foi identificado como um ascorbil éster tanto da bixina quanto da *norbixina*, com a configuração do tipo *cis* e *trans*. O ascorbil éster da bixina seria resultado da esterificação direta do ácido carboxílico da bixina, enquanto o produto da *norbixina* não envolvia uma esterificação direta deste grupo funcional. Para verificar qual desses processos prevalecia durante a reação, eles utilizaram a *norbixina* como um doador de grupo acil. O resultado mostrou que a reação de transesterificação prevalecia sobre a esterificação direta sob estas condições. Uma primeira explicação reside na especificidade da lipase que promove a transesterificação, e na produção de água durante a esterificação direta que é termodinamicamente desfavorável à síntese do éster. De acordo com a especificidade da enzima e sua alta reatividade, a reação de

esterificação deve ocorrer no grupamento alcoólico do carbono seis do ácido ascórbico (HUMEAU *et al.*, 2000).

Neste trabalho empregou-se a mesma metodologia para a verificação de alterações nas moléculas dos carotenóides. Tanto a astaxantina quanto a bixina foram submetidas a uma reação de esterificação, utilizando como substrato para tal reação o ácido ascórbico. Esta mesma reação foi realizada com três enzimas de origens diferentes para verificar se este tipo de transformação é comum a várias lipases ou específica a um tipo de enzima desta classe. Decorrido o tempo de incubação do experimento, as amostras dos carotenóides foram analisadas por espectrofotômetro para a verificação de alterações no perfil do carotenóide padrão. Estas análises estão representadas nas figuras 50 e 51 (reação com astaxantina e bixina, respectivamente).

FIGURA 50 – ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA NA REGIÃO DO VISÍVEL DAS AMOSTRAS DE BIXINA MODIFICADAS ENZIMATICAMENTE

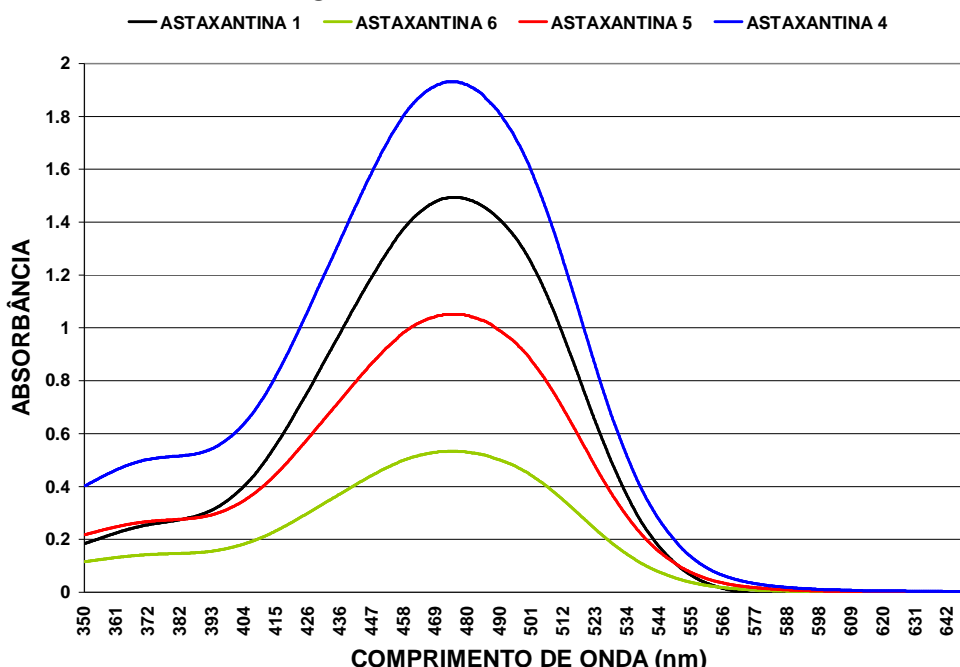


As amostras de bixina modificadas pelas enzimas estavam em solução etanólica na concentração de 17 μ moles/L. As comparações foram feitas entre a amostra de bixina padrão (bixina 1) e as amostras de bixina que foram submetidas a incubação na presença de ácido ascórbico por 72 horas a 35°C com a enzima NOVOZYME 435® (bixina 4), LIPOZYME TL IM® (bixina 5) e lipase bovina (bixina 6), conforme descrito no item 3.2.4.1 de Material e Métodos. As curvas mostradas são representativas de 3 leituras independentes.

A análise da absorbância entre 350 e 647 nm das amostras de bixina modificadas enzimaticamente na presença do ácido ascórbico revela uma diminuição na solubilidade em etanol de todas as amostras ensaiadas. A enzima NOVOZYME 435[®] foi a que apresentou um efeito mais pronunciado na diminuição do valor da absorbância (cerca de 30%) e a LIPOZYME TL IM[®] e a lipase de origem bovina apresentaram uma diminuição de aproximadamente 10% e 14%, respectivamente em relação ao pico de 450 nm (figura 50).

No caso da astaxantina (figura 51), pode-se observar que a amostra tratada com a lipase NOVOZYME 435[®] na presença de vitamina C (ascorbato) teve sua absorbância aumentada em cerca de 25%. As demais enzimas provocaram um efeito contrário, levando à diminuição da absorbância das amostras em 30% e 65% para a lipase LIPOZYME TL IM[®] e lipase bovina, respectivamente.

FIGURA 51 – ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA NA REGIÃO DO VISÍVEL DAS AMOSTRAS DE ASTAXANTINA MODIFICADAS ENZIMATICAMENTE



As amostras de astaxantina modificadas pelas enzimas estavam em solução etanólica na concentração de 15 $\mu\text{moles/L}$. As comparações foram feitas entre a amostra de astaxantina padrão (astaxantina 1) e as amostras de astaxantina que foram submetidas a incubação na presença de ácido ascórbico por 72 horas a 35°C com a enzima NOVOZYME 435[®] (astaxantina 4), LIPOZYME TL IM[®] (astaxantina 5) e lipase bovina (astaxantina 6), conforme descrito no item 3.2.4.1 de Material e Métodos. As curvas mostradas são representativas de 3 leituras independentes.

A lipase NOVOZYME 435[®] é uma lipase B de *Candida antarctica* produzida por fermentação submersa do microorganismo *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado e adsorvido em resina macroporosa. Esta enzima possui a forma de micro-esferas (0,3 – 0,9 mm) e um conteúdo de água de 1 a 2% (p/p). A enzima é uma triacilhidrolase (E.C.3.1.1.3) e também uma efetiva carboxilesterase. A especificidade posicional da NOVOZYME 435[®] depende dos reagentes. Em algumas reações mostra ter especificidade pelas posições 1 e 3 enquanto que em outras reações funciona como uma lipase sem especificidade posicional. Este produto é particularmente utilizado na síntese de ésteres e amidas. Ele possui uma ampla especificidade de produtos, ou seja, promove a reação entre uma vasta faixa de álcoois primários e secundários e ácidos carboxílicos. Ela trabalha bem tanto em sistemas livres de solventes quanto em reações que utilizam solventes inertes como o éter de petróleo ou o hexano (NOVOZYMES, 2001).

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Vários métodos têm sido aplicados para avaliar a atividade antioxidante, mas deve-se ter em mente que não existe um método universal simples pelo qual esta atividade possa ser medida de forma precisa e quantitativa.

A atividade antioxidante (ou capacidade ou potencial antioxidante) é um parâmetro utilizado vastamente em conjunto com outros, para caracterizar diferentes materiais biológicos. Esta atividade está relacionada com compostos capazes de proteger um sistema biológico do efeito potencialmente danoso do processo ou das reações que causam oxidação excessiva, envolvendo as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). Os métodos de fácil realização, rápidos e bastantes sensíveis e ainda mais comuns para avaliar a capacidade antioxidante são aqueles que envolvem radicais livres que possuem cor, simulando as ERO. A presença de uma substância antioxidante leva, então, ao desaparecimento deste radical (ARNAO, 2000).

Durante a medida da atividade antioxidante dois fatores devem ser levados em consideração. O primeiro é que a eficiência do seqüestro do radical é determinada não apenas pela reatividade do antioxidante contra o radical, mas também pela sua concentração. Muitos antioxidantes reagem muito rapidamente com radicais hidroxila, mas muitas moléculas biológicas que são muito mais abundantes do que os antioxidantes também reagem de forma muito rápida com os radicais hidroxila. O segundo fator está relacionado com o espectro de ação do antioxidante. Por exemplo, a vitamina C é um potente seqüestrador de radicais hidrofílicos, mas não de radicais lipofílicos (NIKI, 2002).

4.5.1 Avaliação pelo Método de Descoloração do DPPH

O DPPH[•] é um radical livre colorido que pode ser dissolvido em solventes orgânicos (especialmente em meio alcoólico) e apresenta um pico de absorbância máxima em 515 nm ($\epsilon = 33,6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) em meio metanólico. Este radical apresenta uma cinética de reação bifásica com vários antioxidantes (ARNAO, 2000).

O método de descoloração do radical é baseado na redução de soluções alcoólicas de DPPH[•] medida em 515 – 520 nm graças à interação de um antioxidante doador de hidrogênio (AH), levando a formação da espécie não-radical DPPH-H pela reação:



O DPPH[•] remanescente, medido após um certo período de tempo, corresponde inversamente à atividade seqüestradora do radical do antioxidante. O método não é discriminativo quanto à espécie do radical, mas dá uma idéia geral sobre a capacidade de seqüestro do antioxidante. A sensibilidade do método é dada pela redução da forte absorção no comprimento de onda especificado (515 nm, em etanol). O método é rápido, não necessita de reagentes caros ou equipamentos

sofisticados (KOLEVA *et al.*, 2002).

No método do DPPH a eficiência do antioxidante é medida em temperatura ambiente, o que elimina o risco de degradação térmica das moléculas testadas (BONDET *et al.*, 1997).

Usualmente, a mudança da coloração violeta para amarela é avaliada através da medida do desaparecimento da cor violeta em 515 nm, mas também pode ser monitorada pelo aparecimento do produto de coloração amarela. A intensidade da cor amarela aumenta com o tempo enquanto a reação entre o antioxidante e o DPPH[•] ocorre. Assim sendo, espera-se que logo que o antioxidante (AH) seja completamente transformado em A[•] (para amostras com pequenas quantidades de antioxidantes, isto é, quando a $[AH] < [DPPH^{\bullet}]$), ou quando o DPPH[•] seja completamente reduzido a DPPH-H (quando $[AH] > [DPPH^{\bullet}]$), a intensidade da coloração amarela irá atingir um valor constante. Além do mais, a cor natural da amostra de caroteno (vermelho ou laranja se concentrado; amarelo, se diluído) pode também causar interferências. Por exemplo, o vinho tinto possui uma série de componentes também violetas (antocianinas), que atuam como antioxidantes. Nas amostras de chás, a cor das amostras polifenólicas mais concentradas é marrom (SOLER-RIVAS *et al.*, 2000).

Baseando-se nestas informações e nas observações feitas durante a elaboração deste trabalho, foi realizado um experimento bastante simples, mas que dá uma idéia adequada do potencial antioxidante dos modelos carotenóides estudados. Foram utilizadas placas de 96 poços onde foram colocadas soluções do radical DPPH[•] a 80 µmoles/L e soluções com concentrações crescentes de carotenóides. Após o tempo de 20 minutos as amostras foram inspecionadas visualmente para se obter uma idéia do poder antioxidantes das mesmas. Nas figuras 52, 53 e 54 pode-se ter a comprovação visual da capacidade antioxidante do carotenóide trabalhado e até do modo de ação do mesmo no que depende da sua concentração. Estas amostras também foram analisadas por espectrofotometria e os

resultados desta análise serão comentados mais adiante.

Com uma simples observação nas alterações provocadas na coloração das amostras fica facilitado o entendimento da capacidade antioxidante das amostras testadas. Quando se analisa a amostra de astaxantina, percebe-se facilmente que aquelas que foram modificadas enzimaticamente tiveram seu poder de oxidação bastante acentuadas (figura 52), mostrando-se mais efetivas em consumir o radical livre DPPH[•] do que a amostra padrão ou as modificadas quimicamente. Não se pode fazer uma comparação isonômica com o padrão de antioxidante utilizado (Trolox C) pelo fato deste não possuir cor.

FIGURA 52 – FOTOGRAFIA DAS AMOSTRAS DE ASTAXANTINA E SEUS DERIVADOS QUÍMICOS E ENZIMÁTICOS APÓS REAÇÃO COM DPPH[•]



As linhas de A até H correspondem às amostras dos carotenóides em ordem crescente de concentração, da esquerda para a direita): A = astaxantina (0,6 a 8 $\mu\text{moles/L}$); B = Trolox + DPPH[•] (0,5 a 74,8 $\mu\text{moles/L}$); C = astaxantina + DPPH[•] (0,6 a 8 $\mu\text{moles/L}$); D = astaxantina modificada por lipase 435 + DPPH[•] (0,6 a 6,6 $\mu\text{moles/L}$); E = astaxantina modificada pela enzima TL IM + DPPH[•] (0,5 a 5,2 $\mu\text{moles/L}$) F = astaxantina modificada pela enzima bovina + DPPH[•] (0,4 a 4,6 $\mu\text{moles/L}$) G = astaxantina modificada com anidrido acético + DPPH[•] (0,7 a 6,7 $\mu\text{moles/L}$) e H = astaxantina modificada com anidrido acético e piridina + DPPH[•] (0,9 a 9,2 $\mu\text{moles/L}$). A primeira coluna mostra a coloração do DPPH[•] na concentração utilizada durante o experimento (80 $\mu\text{moles/L}$). As amostras foram posicionadas em seus respectivos poços após 20min de reação ao abrigo da luz, conforme o item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos.

O Trolox C, que é um antioxidante fenólico originalmente desenhado para a preservação de alimentos, possui uma estrutura cromana similar ao α -tocoferol, mas sem a cauda poli-isoprenóide hidrofóbica. Ele é tanto hidro- quanto lipossolúvel e tem sido estudado quimicamente por sua atividade degradadora de radicais livres e terapeuticamente por sua capacidade em limitar o infarto do miocárdio e prevenir necroses pancreáticas causadas pela peroxidação lipídica (SUN & DUNFORD, 1993; DELICADO *et al.*, 1997).

FIGURA 53 – FOTOGRAFIA DAS AMOSTRAS DE BIXINA E SEUS DERIVADOS QUÍMICOS E ENZIMÁTICOS APÓS REAÇÃO COM DPPH[•]



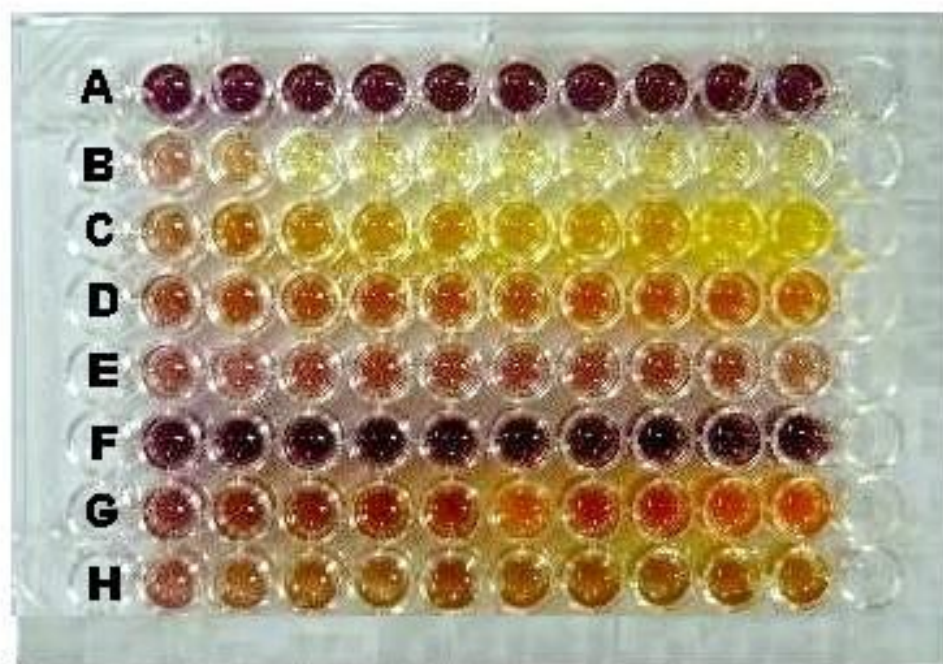
As linhas de A até H correspondem às amostras dos carotenóides em ordem crescente de concentração, da esquerda para a direita); A = bixina (1,2 a 13,2 μ moles/L); B = Trolox + DPPH[•] (0,5 a 74,8 μ moles/L); C = bixina + DPPH[•] (1,2 a 13,2 μ moles/L); D = bixina modificada por lipase 435 + DPPH[•] (0,1 a 1,3 μ moles/L); E = bixina modificada pela enzima TL IM + DPPH[•] (0,6 a 6,1 μ moles/L); F=bixina + enzima bovina + DPPH[•](0,03 a 0,36 μ moles/L); G= bixina modificada com anidrido acético + DPPH[•] (0 a 6,5 μ moles/L) e H = bixina modificada com anidrido acético e piridina + DPPH[•] (1 a 38,7 μ moles/L). A primeira coluna mostra a coloração do DPPH[•] na concentração utilizada durante o experimento (80 μ moles/L) e as demais colunas correspondem as concentrações crescentes utilizadas das amostras. As amostras foram posicionadas em seus respectivos poços após 20min de reação ao abrigo da luz, conforme o item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos.

Na figura 53 se pode observar que a bixina possui uma capacidade antioxidante menor que a da astaxantina. Aparentemente, ela é capaz de reagir com o DPPH[•], mas sem muita eficiência. As alterações sofridas pelo tratamento da bixina

com enzimas parecem ter tido um efeito mais pronunciado na capacidade deste carotenóide de reduzir o radical livre, sendo que o tratamento mais eficiente foi o realizado com a lipase de origem bovina.

Em relação às outras amostras de carotenóides testadas (figura 54) pode-se observar que o etil éster do ácido apocarotenóico foi o mais eficiente dentre os carotenóides e que a cantaxantina também apresentou resultados positivos. Por outro lado, o licopeno parece ter sua capacidade de reação com o radical limitada e o β -caroteno parece não ser capaz de degradar redutivamente o DPPH[•], o que não significa que não apresentem propriedades antioxidantes nas concentrações utilizadas.

FIGURA 54 – FOTOGRAFIA DAS AMOSTRAS DE OUTROS CAROTENÓIDES APÓS REAÇÃO COM DPPH[•]



As linhas de A até H correspondem às amostras dos carotenóides em ordem crescente de concentração, da esquerda para a direita): A = DPPH[•] (80 μ moles/L); B = Trolox + DPPH[•] (0,5 a 74,8 μ moles/L); C = etil éster do ácido apocarotenóico + DPPH[•] (3,1 a 26,1 μ moles/L); D = cantaxantina + DPPH[•] (1,6 a 16,8 μ moles/L); E = licopeno + DPPH[•] (0,1 a 1,1 μ moles/L); F = β -caroteno + DPPH[•] (0,07 a 1,7 μ moles/L); G = astaxantina + DPPH[•] (0,6 a 8 μ moles/L) e H = bixina + DPPH[•] (1,2 a 13,2 μ moles/L). As amostras foram posicionadas em seus respectivos poços após 20min de reação ao abrigo da luz, conforme o item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos.

As análises feitas neste item são apenas de caráter intuitivo, uma vez que foram realizadas com base na avaliação visual da coloração resultante da reação entre os carotenóides e o DPPH[•]. Uma análise mais crítica e conclusiva será feita posteriormente, tomando como base os resultados obtidos nos experimentos que utilizam técnicas mais precisas e confiáveis.

4.5.1.1 Espectrofotometria

Vários pesquisadores já examinaram a capacidade de doação de prótons de substâncias antioxidantes atuando como seqüestradoras de radicais livres. O DPPH[•] em etanol ou clorofórmio possui uma forte absorção na faixa de 510-520 nm, o que lhe confere uma coloração violeta. Este composto pode aceitar um elétron ou um hidrogênio ($H^+ + e^-$) e tornar-se um produto irreversivelmente estável. Tão logo o elétron do radical livre torna-se emparelhado na presença de um doador de hidrogênio (antioxidante), a absorção diminui de forma estequiométrica ao número de elétrons doados (consumidos).

Quando o objetivo é o de se estimar a atividade antioxidante de amostras biológicas, os cromógenos possuem uma importante limitação porque interferências em comprimentos de onda específicos podem ocorrer. Estas interferências surgem por causa da presença de compostos coloridos (por exemplo: antocianinas, carotenóides) nas amostras ou devido ao aparecimento de produtos de reação secundários entre o cromógeno e as amostras analisadas. No caso do método do DPPH este problema é mais sério, já que ele não apresenta bandas de absorção outras que não aquela em 515 nm. Desta forma, perto desta região do espectro visível, a atividade antioxidante medida pode estar sendo subestimada. Mas apesar destes inconvenientes, o método do DPPH continua sendo vastamente utilizado para caracterizar material derivado de plantas (ARNAO, 2000). Para que se possa ter uma visão panorâmica do perfil espectrofotométrico das amostras em estudo, foi elaborada uma figura onde estão agrupados todos os espectros de varredura (UV

e/ou na região do visível) obtidos (carotenóides, DPPH[•] e o antioxidante padrão – Trolox C) – ANEXO I.

Com o objetivo de minimizar as interferências causadas pela cor dos carotenóides, foi realizado um simples teste de solubilidade dos carotenóides no solvente de escolha do método, o etanol. Quantidades conhecidas de cada carotenóide foram solubilizadas em etanol e centrifugadas. O precipitado no tubo de centrifugação foi pesado e seu valor foi descontado da quantidade inicial do carotenóide. Desta maneira, poder-se-á avaliar de forma mais fidedigna os resultados obtidos, não cometendo nem super- e nem subestimações da capacidade antioxidante de cada carotenóide estudado.

Pode-se perceber que o β -caroteno foi a amostra estudada que apresentou o menor grau de solubilidade no etanol, solvente de eleição para a realização de todos os experimentos, o que poderia não permitir uma análise precisa do efeito do DPPH[•] com este carotenóide. Não seria possível distinguir se o efeito surtido ocorreria por causa da pouca atividade antioxidante do β -caroteno ou devido a sua baixa solubilidade no meio utilizado. O licopeno e o etil éster do ácido apocarotenóico apresentaram uma dissolução quase que completa (95% e 98,5% respectivamente), significando que os resultados obtidos com estas amostras serão fiéis ao que acontece na realidade. Já as demais amostras apresentaram uma solubilidade maior que 50% (61%, 73% e 74% respectivamente para a bixina, astaxantina e cantaxantina). Entretanto, a faixa de concentração de carotenóides utilizada para os experimentos permitiu uma completa solubilização das amostras em etanol.

Na utilização de métodos colorimétricos para determinar o consumo de DPPH[•], a atividade antioxidante das amostras é medida como a quantidade do radical DPPH[•] consumido (SUBAGIO & MORITA, 2001).

Com a realização de um experimento padrão de consumo do radical DPPH[•] pelo carotenóide após um período de 20 minutos, podem-se traçar algumas considerações sobre a capacidade antioxidante do carotenóide em estudo.

Conforme descrito em Material e Métodos, a atividade antioxidante de cada carotenóide foi calculada em relação à porcentagem de redução da absorbância do DPPH* (tabela 2).

TABELA 2 – REDUÇÃO DA ABSORBÂNCIA DO DPPH ATRAVÉS DA AÇÃO ANTIOXIDANTE DE DIVERSOS CAROTENÓIDES

CAROTENÓIDE (μ moles/L)	REDUÇÃO NA ABSORBÂNCIA EM 515 nm (%)									
	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
Astaxantina 1*	0,6	2,4	N. A.	4,1	5,8	6,4	N. A.	7,5	N. A.	N. A.
Astaxantina 4**	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	0,6	1,8
Astaxantina 5**	0,5	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	1,7	N. A.
Astaxantina 6**	0,4	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	1,2	1,6	N. A.	N. A.
Bixina 1*	1,2	11,8	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
Bixina 3***	13	17,6	25,8	34,8	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
Bixina 4**	N. A.	0,1	0,5	0,7	1,2	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
Bixina 5**	0,6	1,7	3,1	3,8	5,5	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
Bixina 6**	0,03	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	0,07	N. A.	N. A.	0,1
Cantaxantina*	N. A.	5,2	N. A.	7,1	N. A.	8,8	10,5	12,1	13,7	15,3
CY*	3,1	9,4	12,6	18,6	23,6	26,1	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
Licopeno*	0,3	1,1	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.	N. A.
Trolox C*	N. A.	0,5	N. A.	N. A.	11,3	N. A.	N. A.	24,1	48,8	N. A.

Os valores representados na tabela acima expressam a quantidade de amostra (μ moles/L) necessária para atingir a porcentagem referida de diminuição da absorção em 515 nm após reação por 20 minutos com o radical livre.

* refere-se à amostra padrão, sem nenhum tipo de tratamento;

** refere-se às amostras que sofreram modificação enzimática (4 = tratamento com NOVOZYME 435®, 5 = tratamento com LIPOZYME TL IM® e 6 = tratamento com lipase bovina).

*** refere-se às amostras que foram modificadas quimicamente (3 = acetilação com anidrido acético e piridina);

N.A. = valor não atingido

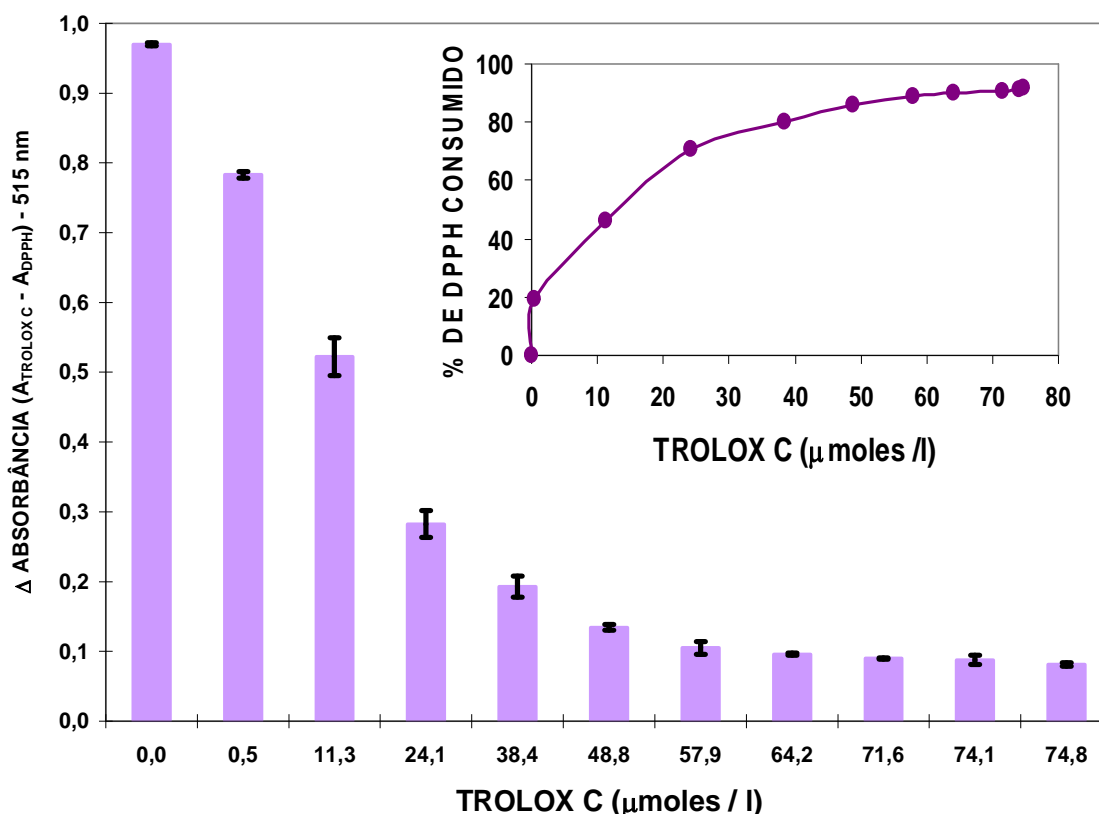
Como os carotenóides são substâncias coloridas e absorvem luz em comprimentos de onda próximos ao $\lambda_{\text{máx}}$ do radical livre, foram traçadas curvas de

calibração para cada amostra no mesmo comprimento de onda de maior absorção do DPPH[•] (515 nm) - ANEXO II. Os valores de absorbância obtidos foram diminuídos do valor total de absorbância do meio reacional (após 20 minutos), para que a cor do carotenóide não fosse causa de nenhuma interferência nos resultados obtidos. Os valores obtidos na tabela 2 serão discutidos juntamente com a análise dos dados específicos para cada substância antioxidante estudada. Esta análise será iniciada pela capacidade do Trolox C (utilizado como antioxidante padrão) em reduzir o DPPH[•].

O Trolox C é um composto análogo da vitamina E (α -tocoferol) que possui uma estrutura cromana similar a vitamina E, porém sem sua cauda hidrofóbica. A sua ação antioxidante parece ser devida à doação de átomos de hidrogênio ao radical livre, com a formação de radicais derivados do antioxidante (SUN & DUNFORD, 1993). Em sua estrutura o Trolox C apresenta 1 grupo OH e 1 um grupo COOH. Este antioxidante foi capaz de reduzir aproximadamente 92% do DPPH[•] presente no meio reacional, como pode ser observado pela figura 55. Como pode ser observado, em concentrações próximas de 10 μ moles/L, o Trolox C é capaz de reduzir cerca de 50% do total do radical livre presente. Quando a sua concentração chega perto dos 25 μ moles/L ocorre a redução de cerca de 71% nos valores de absorbância das amostras no comprimento de onda referente ao DPPH[•]. A partir desta concentração (até um valor final de 75 μ moles/L da substância antioxidante) a redução do radical parece atingir um estado de equilíbrio, já que a diminuição obtida dos valores de absorbância permanece na faixa de 89% a 92%.

Em seguida, foi analisada a atividade antioxidante dos carotenóides classificados como hidrocarbonetos (licopeno e β -caroteno). O licopeno possui uma estrutura acíclica com 11 duplas ligações conjugadas. Estas ligações são susceptíveis a oxidação, tornando o licopeno um potente antioxidante. Já o β -caroteno se diferencia do licopeno pela presença do anel β -ionona nas duas extremidades da molécula.

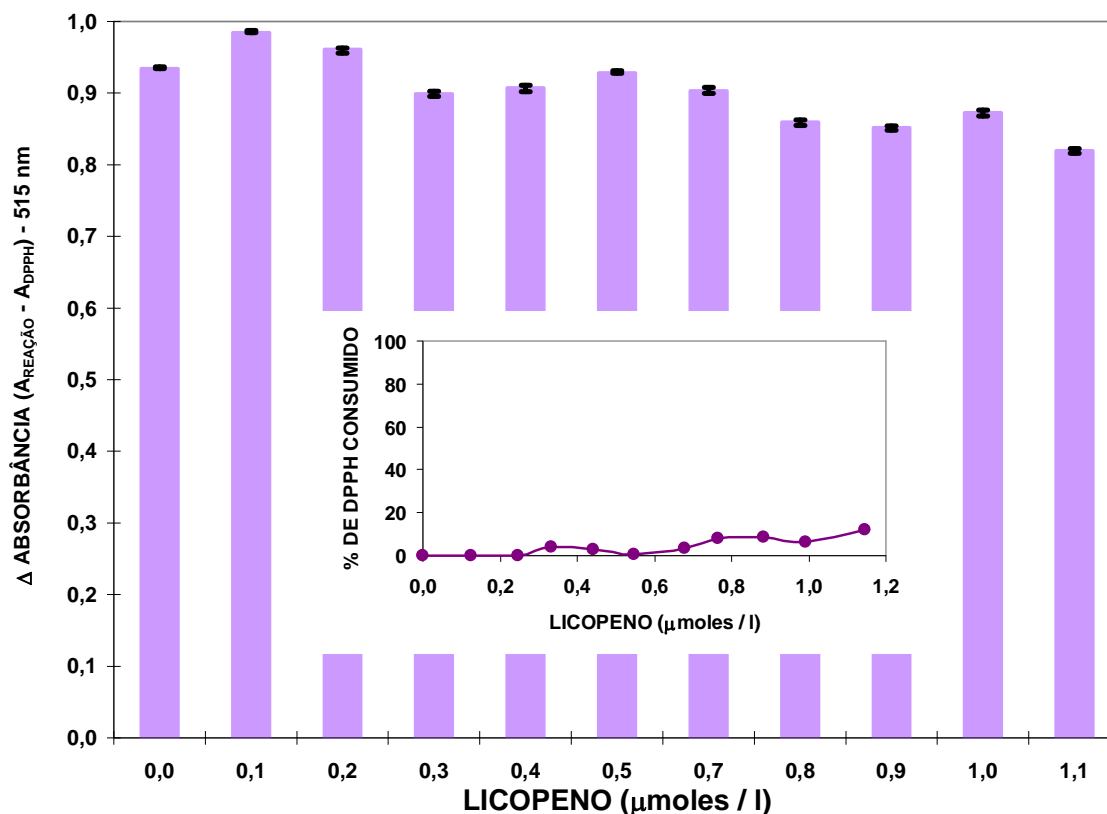
FIGURA 55 – CONSUMO DO RADICAL DPPH* PELO TROLOX C



Tanto o radical livre (80 $\mu\text{moles/L}$) quanto o antioxidante estavam solubilizados em solução etanólica. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro após 20min de reação (item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos), utilizando como controle do experimento a amostra de DPPH* sem adição de nenhum antioxidante. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes \pm desvio-padrão. O gráfico inserido na figura representa a porcentagem de DPPH* consumido.

Os resultados obtidos da reação entre o licopeno e o DPPH* estão mostrados na figura 56. O licopeno não se mostrou um potente agente antioxidante em relação ao radical livre DPPH*, pois com a concentração mais alta utilizada no experimento (1,1 $\mu\text{moles/L}$), só foi capaz de reduzir cerca de 10% do radical. Sua atividade antioxidante só começa a ser percebida a partir de 0,3 $\mu\text{moles/L}$, quando este carotenóide consegue consumir 4% do radical. Pelo gráfico pode-se perceber que a redução deste radical acontece de forma independente da dose nas concentrações utilizadas.

FIGURA 56 - CONSUMO DO RADICAL DPPH* PELO LICOPENO



Tanto o radical livre (80 $\mu\text{moles/L}$) quanto o antioxidante estavam solubilizados em solução etanólica. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro após 20min de reação (item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos), utilizando como controle do experimento a amostra de DPPH* sem adição de nenhum antioxidante. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes \pm desvio-padrão. O gráfico inserido na figura representa a porcentagem de DPPH* consumido.

WOODALL *et al.* (1997) realizaram um estudo comparando a atividade antioxidante de carotenóides de reduzir radicais livres do tipo peroxil e observaram que o licopeno foi o único carotenóide que apresentou uma baixa proteção contra a peroxidação lipídica, mas uma alta taxa de destruição. Nas condições estudadas, o licopeno parecia estar promovendo as reações em cadeia do radical livre ao invés de inibi-las no sistema.

A análise dos dados da utilização do β -caroteno revelaram que o mesmo não foi capaz de seqüestrar o radical DPPH* na faixa de concentração de 0,07 a 1,7 $\mu\text{moles/L}$ (dados não mostrados). Este resultado poderia ser atribuído à baixa solubilidade deste carotenóide no etanol (70%). Entretanto, a concentração máxima

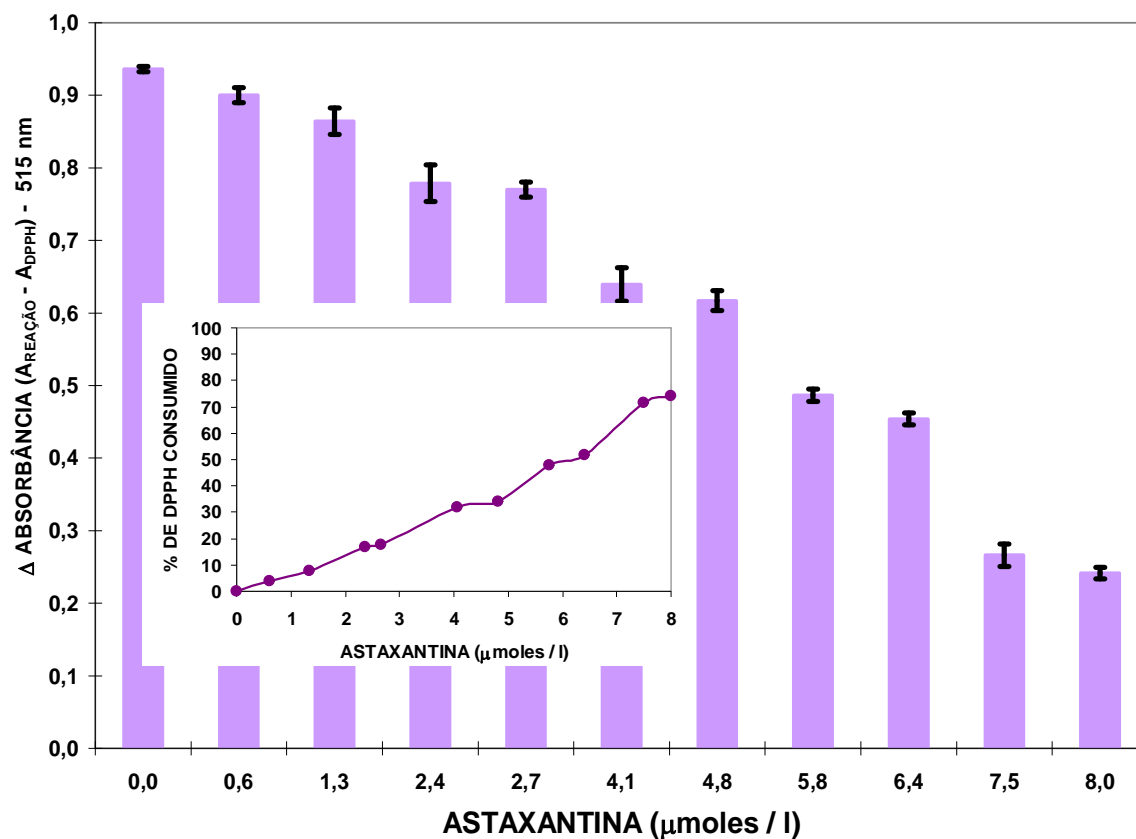
utilizada (1,7 $\mu\text{moles/L}$) encontrava-se perfeitamente dentro de uma faixa de solubilidade, ou seja, apesar de quantidades maiores do β -caroteno serem pouco solúveis em etanol, a quantidade utilizada no experimento mostrou-se completamente solúvel. Outra possibilidade existente para este resultado é a de que a concentração utilizada tenha sido baixa demais para produzir qualquer efeito na reação com o radical livre.

Este resultado está em desacordo com alguns dados da literatura. Em um estudo realizado por SUBAGIO & MORITA (2001) foi sugerido que a presença dos anéis β -ionanos possui um papel relevante no consumo do DPPH $^{\bullet}$. A abstração do átomo de hidrogênio no carbono na posição quatro (C_4) da posição alílica no anel β -ioneno deve ser um dos fatores que influencia a reatividade dos carotenóides contra os radicais livres.

A astaxantina (3,3'-dihidroxi-4,4'-dioxo- β -caroteno) é tida como uma substância mais efetiva do que o β -caroteno na inibição na prevenção da peroxidação lipídica. Entretanto, a razão pela qual isto acontece ainda não está bem entendida (WOODALL *et al.*, 1997; GOTO *et al.*, 2001). Os dados obtidos neste trabalho podem ser evidenciados na figura 57.

A astaxantina, na concentração de 8 $\mu\text{moles/L}$, foi capaz de reduzir aproximadamente 75% de todo o radical livre DPPH $^{\bullet}$ que estava presente no meio de reação. Na concentração de 0,6 $\mu\text{moles/L}$ este carotenóide reduziu aproximadamente 4% do radical e esta redução parece acontecer de forma dose-dependente. A cada aumento de 2 vezes na concentração da astaxantina ocorre um aumento proporcional da sua capacidade de seqüestrar este radical livre. Para exemplificar, temos que nas concentrações de astaxantina de 0,6 – 1,3 – 2,4 – 4,8 e 8 $\mu\text{moles/L}$ houve uma redução do radical de 3,8%, 7,7%, 16,8%, 34% e 74% respectivamente.

FIGURA 57 – CONSUMO DO RADICAL DPPH* PELA ASTAXANTINA



Tanto o radical livre (80 μmoles/L) quanto o antioxidante estavam solubilizados em solução etanólica. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro após 20min de reação (item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos), utilizando como controle do experimento a amostra de DPPH* sem adição de nenhum antioxidante. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes ± desvio-padrão. O gráfico inserido na figura representa a porcentagem de DPPH* consumido.

A astaxantina, como já se é sabido, é um potente sequestrador de oxigênio singlete. Ela é duas vezes mais efetiva que o β-caroteno e aproximadamente 80 vezes mais do que a vitamina E em sequestrar este composto de soluções químicas. Em um sistema *in vitro* utilizando células sanguíneas humanas pré-tratadas com diferentes carotenóides e subsequente expostas ao oxigênio singlete, foi demonstrado que tanto o licopeno quanto a astaxantina eram mais potentes do que o β-caroteno. A astaxantina não compartilha a potencial toxicidade de outros carotenóides com função de pró-vitamina A (como o β-caroteno) já que ela não exerce essa função e é assimetricamente clivada a compostos não-retinóides (CARDOUNEL *et al.*, 2003).

A modificação química feita na astaxantina (acetilação) apenas com anidrido

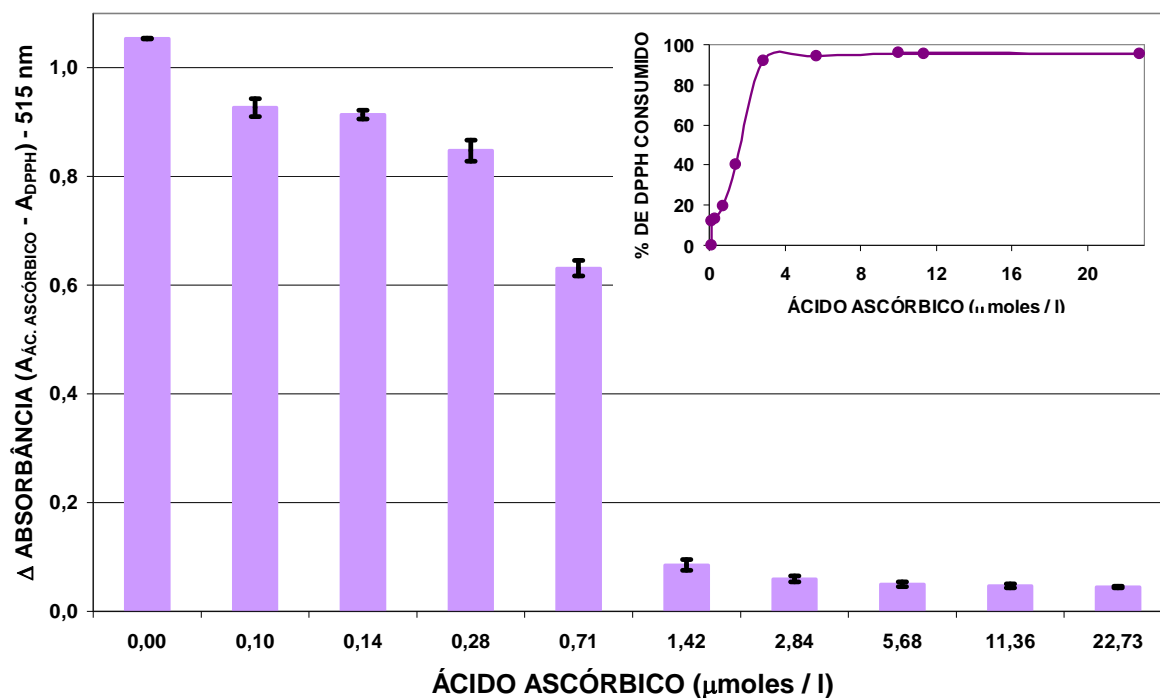
acético ou na amostra tratada com anidrido acético e piridina não foi capaz de causar diminuição na coloração do radical DPPH[•]. As concentrações máximas utilizadas nestes experimentos foram de 6,7 e 8,3 $\mu\text{moles/L}$. Quando concentrações próximas a esses valores foram utilizadas com a astaxantina padrão (sem modificação), eles já foram capazes de reduzir cerca de 50% e 75% do DPPH[•] que estava presente na reação. Este fato pode ser um indício de que a astaxantina durante o processo de acetilação foi química e negativamente alterada e, portanto, perdeu seu poder antioxidante (dados não mostrados).

Já quando a modificação realizada na molécula de astaxantina foi a enzimática, observa-se um comportamento oposto. O consumo do radical livre foi mais eficiente nas modificações realizadas com os três tipos de enzimas testadas. Deve-se levar em consideração, entretanto, que durante a modificação enzimática realizada foi utilizado o ácido ascórbico como substrato para reação. Apesar de terem sido realizados processos para a eliminação de resíduos deste componente que (ver item 3.2.4.1 de Material e Métodos), esta substância ainda pode estar presente de forma isolada na solução contendo o carotenóide modificada pelas enzimas e, desta forma aumentando a capacidade antioxidante da solução devido às suas propriedades antioxidantes e não pela formação de um novo composto. Para verificar esta possibilidade, foi realizado o mesmo experimento (item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos) apenas para a amostra de vitamina C. Durante a reação de esterificação do pigmento pelas lipases, foram utilizadas cerca de 40 $\mu\text{moles/L}$ de ácido ascórbico como substrato para a reação. Em quantidades acima de 1,42 $\mu\text{moles/L}$ da vitamina C, praticamente todo o DPPH[•] que estava presente no meio reacional (80 $\mu\text{moles/L}$) foi prontamente consumido (figura 58).

Pode-se perceber pela gráfico de porcentagem de consumo de DPPH[•] que em concentrações menores do que 0, 71 $\mu\text{moles/L}$ a quantidade de radical livre consumido diminui para 40% do total disponível. No entanto, não se pode afirmar quanto de ácido ascórbico foi utilizado na reação de esterificação, nem tão pouco

supor que sua habilidade seqüestradora de radicais livres tenha sido modificada pela reação com o carotenóide.

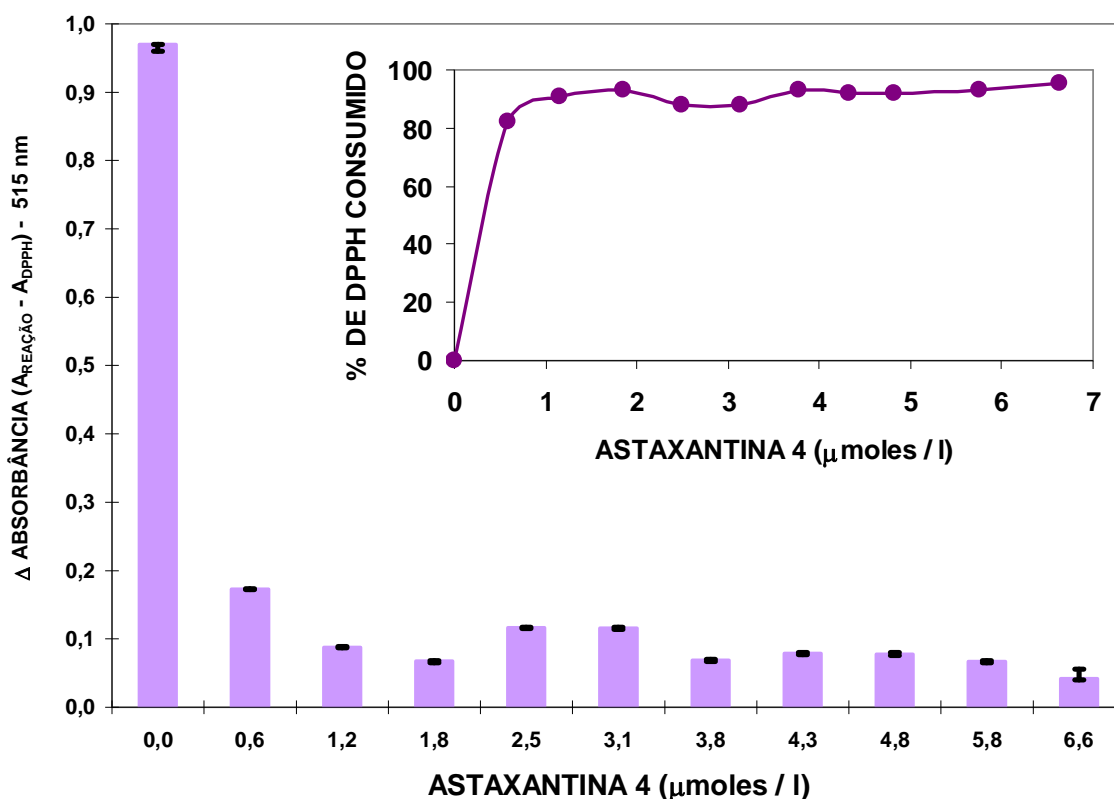
FIGURA 58 – CONSUMO DO RADICAL DPPH[•] PELO ÁCIDO ASCÓRBICO



Tanto o radical livre (80 μmoles/L) quanto o antioxidante estavam solubilizados em solução etanólica. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro após 20min de reação (item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos), utilizando como controle do experimento a amostra de DPPH[•] sem adição de nenhum antioxidante. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes ± desvio-padrão. O gráfico inserido na figura representa a porcentagem de DPPH[•] consumido.

A prévia modificação enzimática realizada na astaxantina padrão com a enzima NOVOZYME 435[®] (astaxantina 4) resultou no consumo de 96% do DPPH[•] presente na solução de reação (figura 59). As concentrações de astaxantina 4 utilizadas neste experimento foram de 0,6 a 6 μmoles/L. Na concentração inicial de 0,6 μmoles/L foram consumidos 82% do radical livre presente. Sem dúvida, esta alteração na estrutura do carotenóide fez com que sua habilidade no seqüestro do DPPH[•] aumentasse significativamente, pois a porcentagem de radical consumida na reação foi cerca de 10% maior do que a conseguida com a astaxantina padrão (8 μmoles/L). Além disso, essa redução na absorbância da solução aconteceu com uma concentração 13 vezes menor do que a utilizada com a amostra padrão.

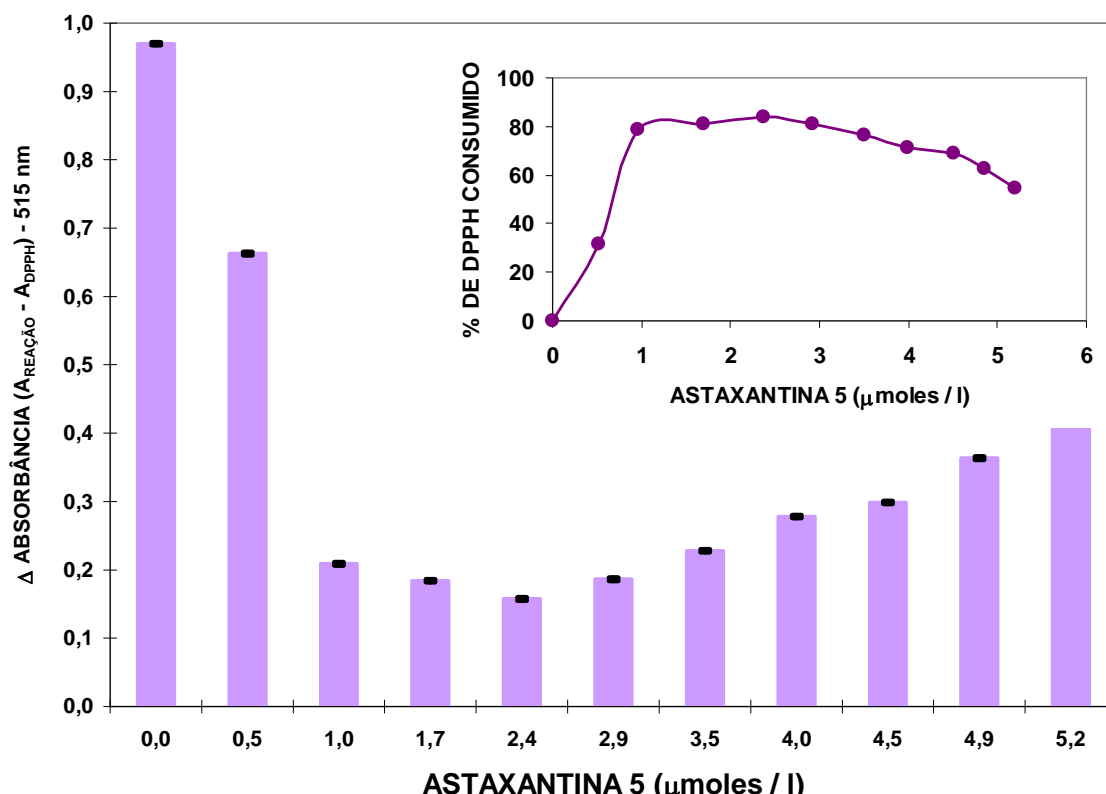
FIGURA 59 – CONSUMO DO RADICAL DPPH* PELA ASTAXANTINA TRATADA COM A ENZIMA NOVOZYME 435®



Tanto o radical livre (80 μmoles/L) quanto o antioxidante estavam solubilizados em solução etanólica. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro após 20min de reação (item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos), utilizando como controle do experimento a amostra de DPPH* sem adição de nenhum antioxidante. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes ± desvio-padrão. O gráfico inserido na figura representa a porcentagem de DPPH* consumido.

A astaxantina que foi tratada com a enzima LIPOZYME TL IM® (astaxantina 5) também se mostrou mais eficiente do que a amostra de astaxantina que não sofreu nenhum tipo de modificação, atingindo cerca de 84% de descoloração do DPPH* (figura 60).

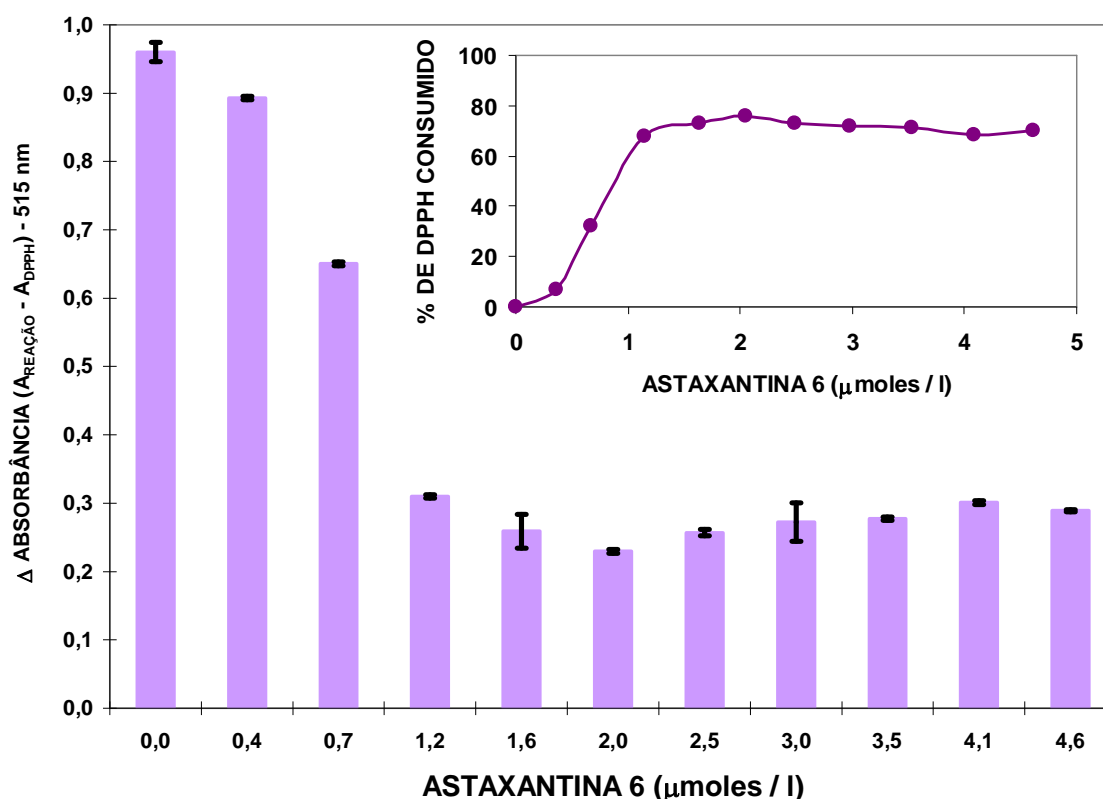
FIGURA 60 – CONSUMO DO RADICAL DPPH[•] PELA ASTAXANTINA TRATADA COM A ENZIMA LIPOZYME TL IM[®]



Tanto o radical livre (80 $\mu\text{moles/L}$) quanto o antioxidante estavam solubilizados em solução etanólica. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro após 20min de reação (item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos), utilizando como controle do experimento a amostra de DPPH[•] sem adição de nenhum antioxidante. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes \pm desvio-padrão. O gráfico inserido na figura representa a porcentagem de DPPH[•] consumido.

A amostra de astaxantina que foi submetida a tratamento com a lipase de origem bovina (astaxantina 6) apresentou um perfil semelhante a astaxantina 5 (figura 61). A redução máxima do radical livre DPPH[•] pela astaxantina 6 foi de 76% quando se utilizou uma concentração de 2 $\mu\text{moles/L}$ do carotenóide modificado. Da mesma forma que para a astaxantina 5, o consumo do DPPH[•] ainda foi 3 vezes maior do que o conseguido com a astaxantina padrão (astaxantina 1). O aumento nas concentrações da amostra também provocou a diminuição da sua capacidade de reduzir o radical livre (porém menos acentuada do que a observada na astaxantina 5), ficando esta praticamente estável no valor de 70% .

FIGURA 61 – CONSUMO DO RADICAL DPPH* PELA ASTAXANTINA TRATADA COM A ENZIMA LIPASE BOVINA



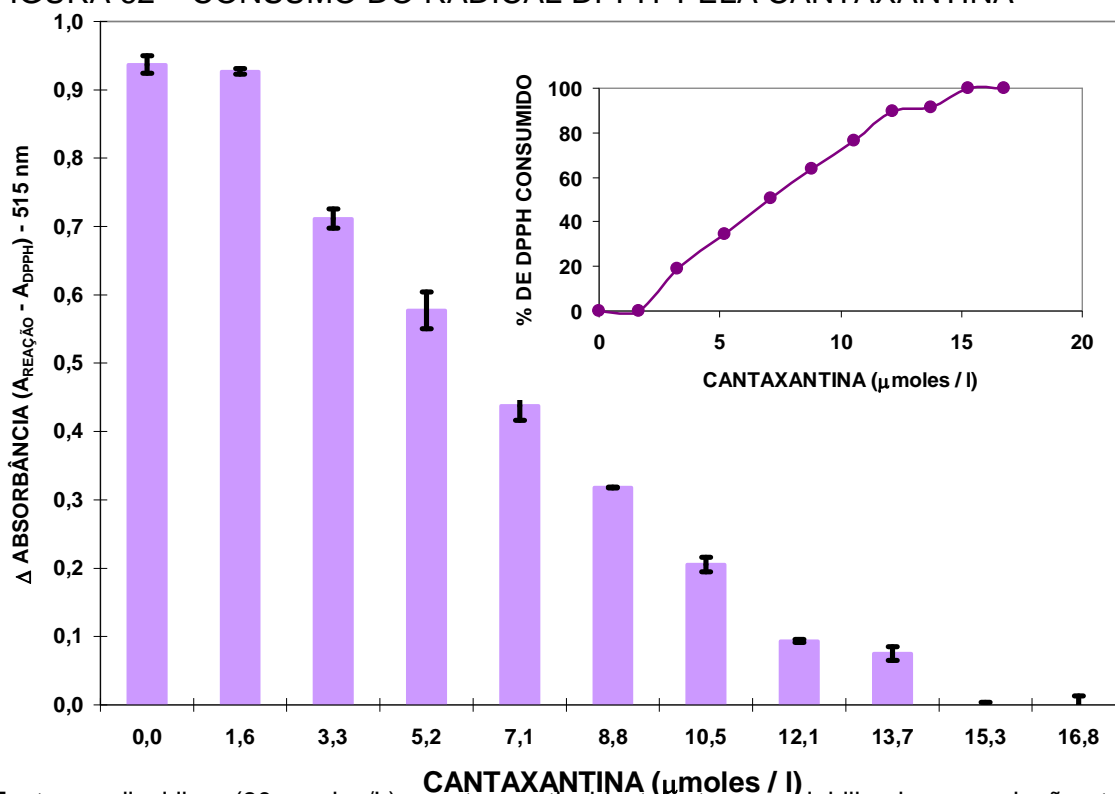
Tanto o radical livre (80 μmoles/L) quanto o antioxidante estavam solubilizados em solução etanólica. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro após 20min de reação (item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos), utilizando como controle do experimento a amostra de DPPH* sem adição de nenhum antioxidante. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes ± desvio-padrão. O gráfico inserido na figura representa a porcentagem de DPPH* consumido.

Fazendo-se uma comparação entre a astaxantina padrão (sem nenhum tipo de modificação) e as amostras de astaxantina que foram modificadas enzimaticamente utilizando o ácido ascórbico como substrato para a reação com diferentes enzimas, pode-se dizer que: a amostra original (padrão) foi capaz de reduzir 75% do DPPH* quando na concentração de 8 μmoles/L. Quando as enzimas utilizadas para realizar a reação de esterificação com a astaxantina foram a NOVOZYME 435®, LIPOZYME TL IM® e a lipase bovina na presença de ácido ascórbico, este percentual aumentou (com uma significativa redução da quantidade da amostra utilizada). Isto pode indicar que a formação do ascorbil éster da astaxantina foi efetuado com sucesso em todas as situações, e que este novo produto foi mais eficiente do que a astaxantina padrão em seqüestrar o DPPH* do

meio. Como o ácido ascórbico é um potente agente antioxidante e a amostra da astaxantina sem modificação também mostrou possuir a habilidade de seqüestro de radicais livres, pode-se supor que esta transformação foi benéfica para a molécula da astaxantina.

Outra xantofila estudada foi a cantaxantina. Este carotenóide difere da astaxantina apenas pelo fato de não possuir em sua estrutura os grupos OH nas posições 4 e 4' dos anéis β -ionanos nas extremidades de sua cadeia. A atividade de seqüestrar o radical DPPH $^{\bullet}$ deste composto está mostrado na figura 62. A molécula da cantaxantina foi capaz de reduzir 100% do radical livre que estava presente na reação. A princípio isto pode parecer um ponto favorável para a cantaxantina em relação a astaxantina, já que a última foi capaz de consumir com apenas 75% do DPPH $^{\bullet}$.

FIGURA 62 – CONSUMO DO RADICAL DPPH $^{\bullet}$ PELA CANTAXANTINA

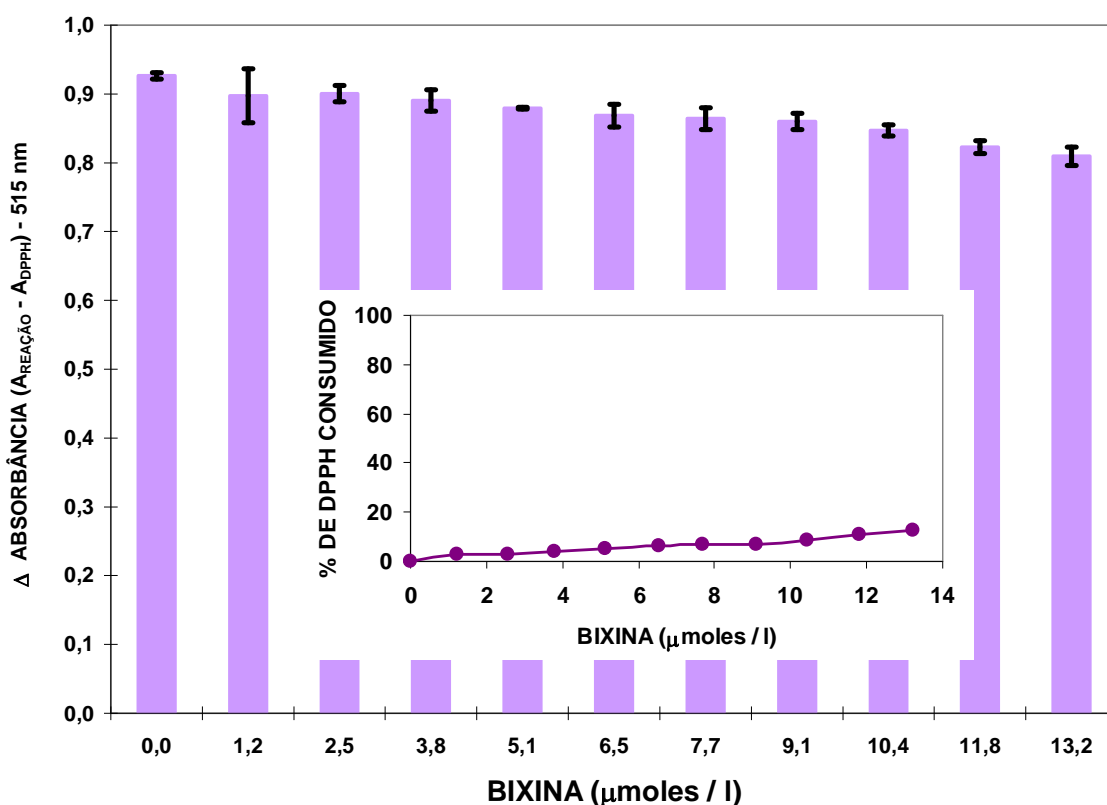


Tanto o radical livre (80 μmoles/L) quanto o antioxidante estavam solubilizados em solução etanólica. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro após 20min de reação (item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos), utilizando como controle do experimento a amostra de DPPH $^{\bullet}$ sem adição de nenhum antioxidante. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes \pm desvio-padrão. O gráfico inserido na figura representa a porcentagem de DPPH $^{\bullet}$ consumido.

Ao se fazer uma análise mais apurada dos dados, pode-se observar que com 8,8 $\mu\text{moles/L}$ da cantaxantina foram consumidos 64% do radical. Ou seja, uma quantidade 10% maior de cantaxantina foi capaz de conseguir um efeito 15% menor do que o obtido com a astaxantina. Quando a cantaxantina atingiu índices de redução do DPPH $^{\bullet}$ de 100% estavam sendo utilizadas concentrações superiores as que foram utilizadas com a astaxantina (15,3 e 16,8 $\mu\text{moles/L}$ de cantaxantina). Como essas concentrações não foram testadas com a astaxantina, não se pode afirmar que a cantaxantina seja mais eficiente do que a astaxantina em seqüestrar o radical livre DPPH $^{\bullet}$.

Os dados referentes ao consumo do DPPH $^{\bullet}$ pela bixina estão mostrados na figura 63.

FIGURA 63 – CONSUMO DE DPPH $^{\bullet}$ PELA BIXINA

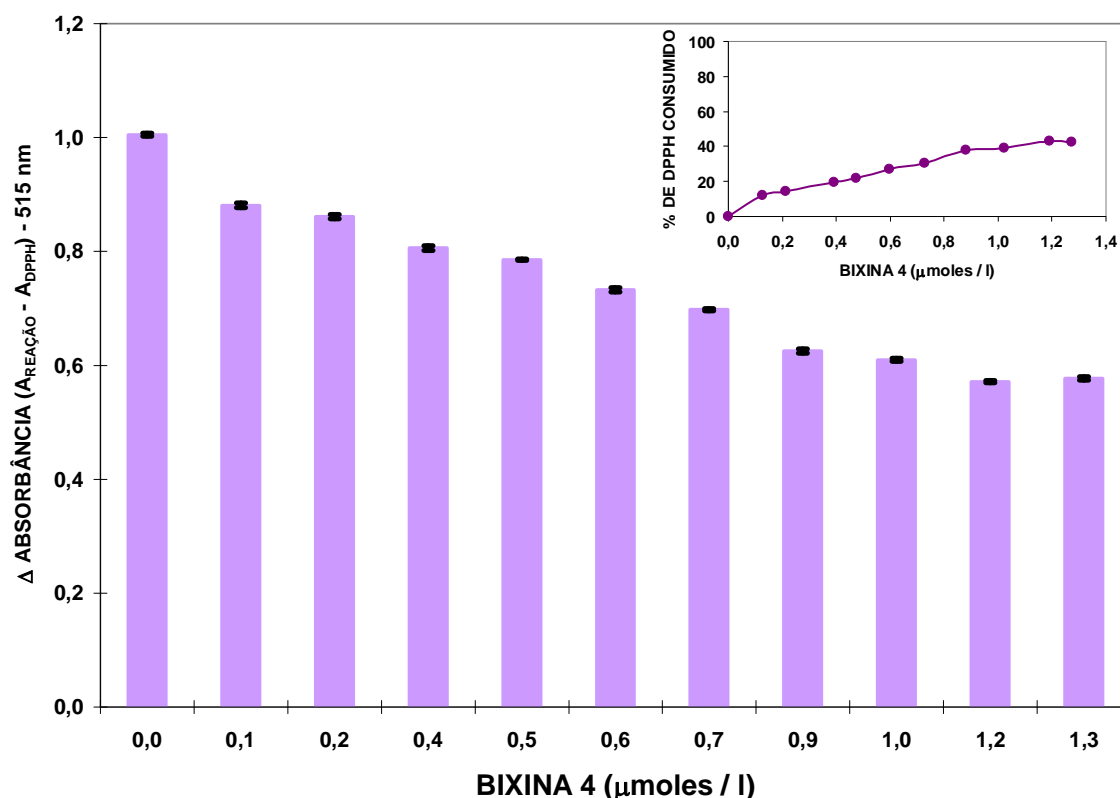


Tanto o radical livre (80 $\mu\text{moles/L}$) quanto o antioxidante estavam solubilizados em solução etanólica. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro após 20min de reação (item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos), utilizando como controle do experimento a amostra de DPPH $^{\bullet}$ sem adição de nenhum antioxidante. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes \pm desvio-padrão. O gráfico inserido na figura representa a porcentagem de DPPH $^{\bullet}$ consumido.

Em relação às amostras de bixina estudadas observa-se que a bixina por si só também foi muito pouco capaz de seqüestrar o radical DPPH[•]. Mesmo quando se utilizou a concentração máxima do antioxidante (13 µmoles/L), apenas cerca de 13% do DPPH[•] foi consumido.

Quando as modificações realizadas na molécula de bixina foram de caráter enzimático observou-se uma mesma proporção de consumo de DPPH[•] (50%), exceto para a amostra tratada com a enzima de origem bovina. Todas as reações das amostras modificadas enzimaticamente com o DPPH[•] seguiram os procedimentos citados no item 3.4.2.1 de Material e Métodos, a fim de garantir que não haveria a presença de ácido ascórbico na sua forma livre no meio reacional. A figura 64 mostra o perfil da alteração da absorbância quando a bixina foi tratada com a enzima NOVOZYME 435[®] (bixina 4).

FIGURA 64 – CONSUMO DO DPPH[•] PELA BIXINA TRATADA COM A ENZIMA NOVOZYME 435[®]

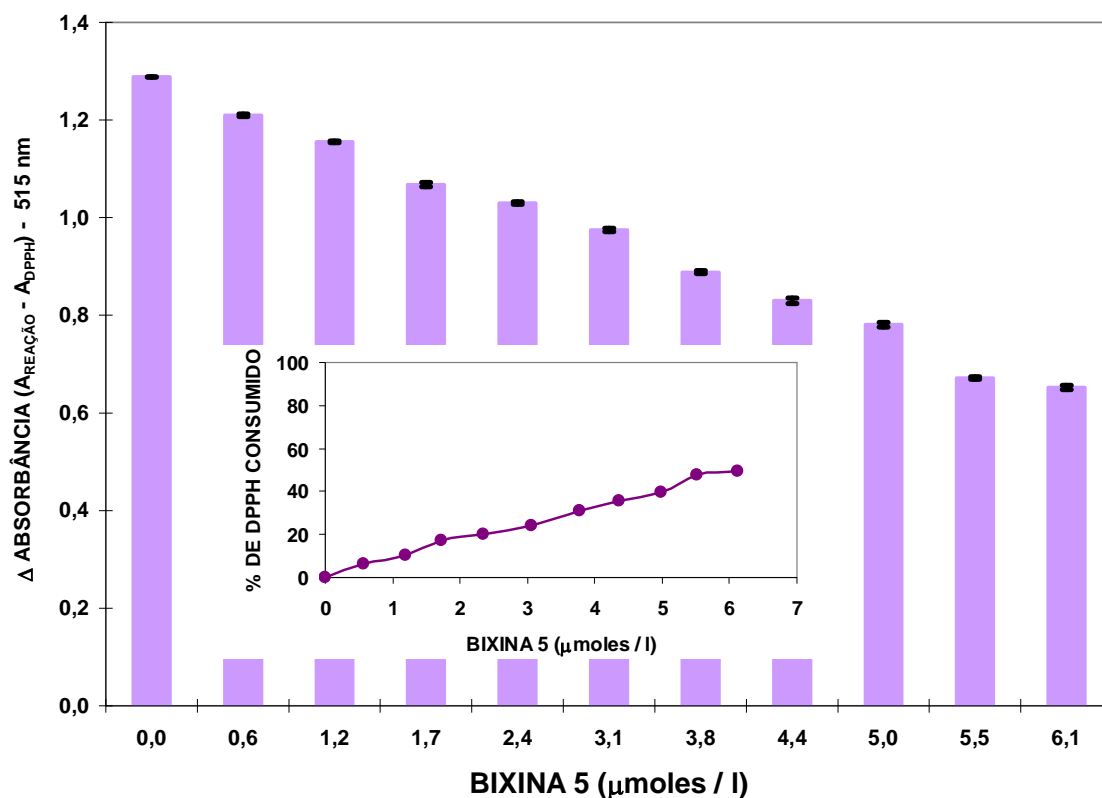


Tanto o radical livre (80 µmoles/L) quanto o antioxidante estavam solubilizados em solução etanólica. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro após 20min de reação (item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos), utilizando como controle do experimento a amostra de DPPH[•] sem adição de nenhum antioxidante. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes ± desvio-padrão. O gráfico inserido na figura representa a porcentagem de DPPH[•] consumido.

Fica evidente que apesar da porcentagem de consumo do radical livre ser a mesma do que a do carotenóide padrão, as concentrações utilizadas da bixina 4 foram cerca de 10 vezes mais baixas. Pode-se perceber que apenas 1,3 $\mu\text{moles/L}$ da bixina 4 foram capazes de reduzir praticamente metade do radical livre disponível no meio reacional.

Quando foram analisados os dados referentes à modificação enzimática realizada na bixina com a enzima LIPOZYME TL IM[®] (bixina 5) se pode notar o mesmo perfil para a redução do radical DPPH^{*}, só que com concentrações da amostra cerca de 5 vezes maior do que no caso da bixina 4 (figura 65), demonstrando uma menor eficiência desta enzima em realizar a reação de esterificação da bixina com o ácido ascórbico.

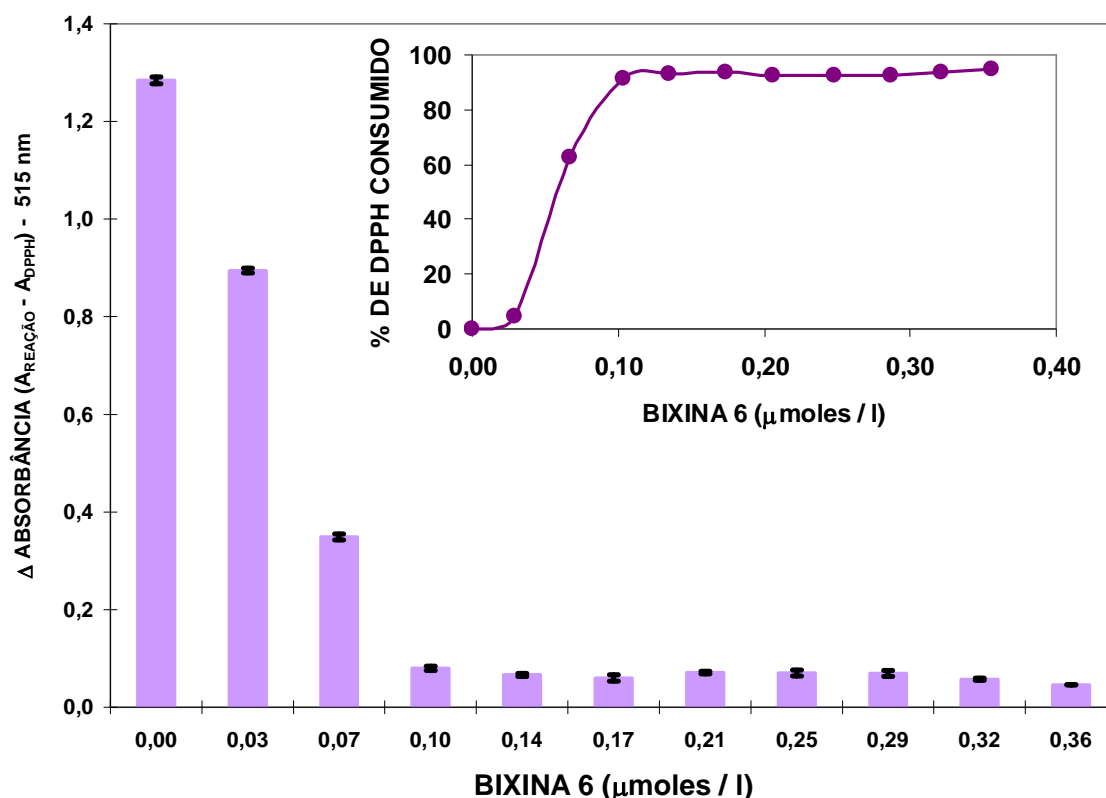
FIGURA 65 – CONSUMO DO RADICAL DPPH^{*} PELA BIXINA TRATADA COM A ENZIMA LIPOZYME TL IM[®]



Tanto o radical livre (80 $\mu\text{moles/L}$) quanto o antioxidante estavam solubilizados em solução etanólica. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro após 20min de reação (item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos), utilizando como controle do experimento a amostra de DPPH^{*} sem adição de nenhum antioxidante. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes \pm desvio-padrão. O gráfico inserido na figura representa a porcentagem de DPPH^{*} consumido.

A enzima bovina foi a que melhor efeito surtiu sobre a molécula da bixina em relação ao consumo de DPPH[•] (figura 66). Na sua presença, cerca de 90% do radical livre foram consumidos. Utilizando uma concentração de apenas 0,07 $\mu\text{moles/L}$ mais da metade de todo o DPPH[•] já havia sido consumido na reação. Com uma concentração de 0,1 $\mu\text{moles/L}$ da bixina 6, já haviam sido reduzidos 90% dos radicais livres.

FIGURA 66 – CONSUMO DO RADICAL DPPH[•] PELA BIXINA TRATADA COM A LIPASE BOVINA



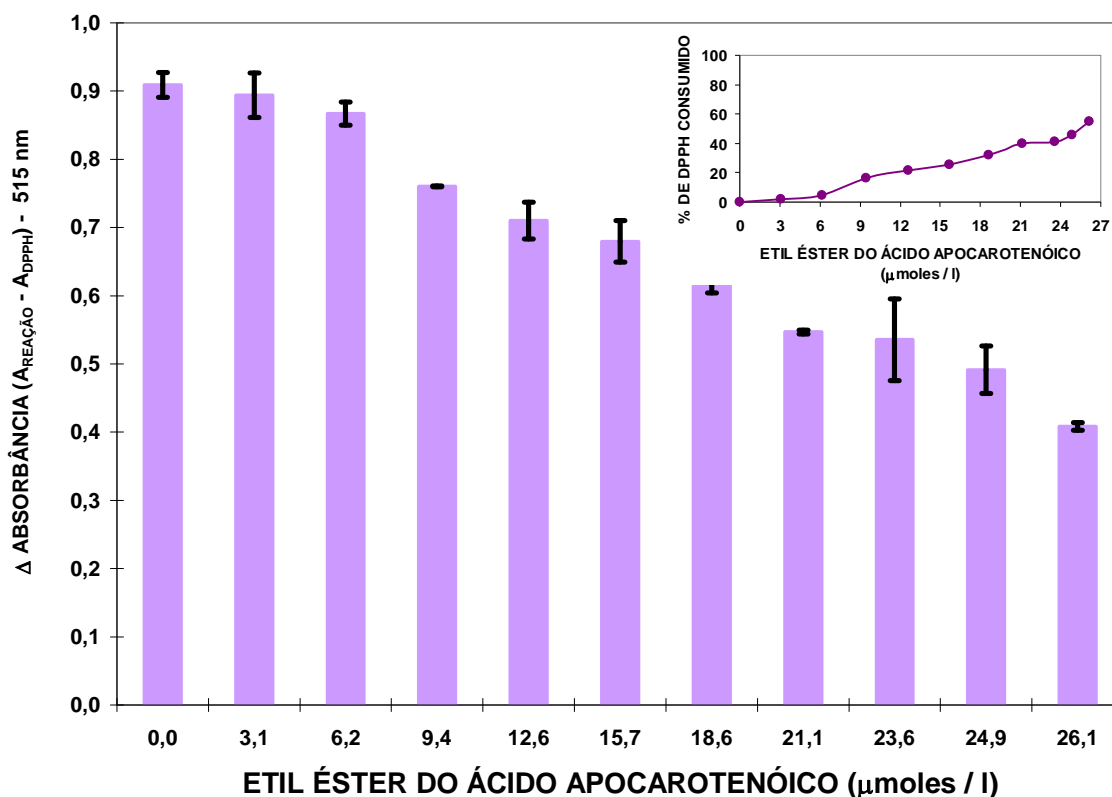
Tanto o radical livre (80 $\mu\text{moles/L}$) quanto o antioxidante estavam solubilizados em solução etanólica. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro após 20min de reação (item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos), utilizando como controle do experimento a amostra de DPPH[•] sem adição de nenhum antioxidante. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes \pm desvio-padrão. O gráfico inserido na figura representa a porcentagem de DPPH[•] consumido.

Fazendo-se uma comparação entre a bixina padrão (sem nenhum tipo de modificação) e as amostras de bixina que foram modificadas enzimaticamente utilizando o ácido ascórbico como substrato para a reação com diferentes enzimas,

pode-se dizer que: a amostra original (padrão) foi capaz de reduzir apenas 13% do DPPH[•] quando na concentração de 13,2 μ moles/L. Quando as enzimas utilizadas para realizar a reação de esterificação com a bixina foram a NOVOZYME 435[®], LIPOZYME TL IM[®] este percentual aumentou para cerca de 50%, e a lipase bovina provocou um aumento para cerca de 90% do radical consumido na presença de ácido ascórbico, (com uma redução da quantidade da amostra utilizada para apenas 0,36 μ moles/L). Isto pode indicar que a formação do ascorbil éster da bixina foi efetuado com sucesso em todas as situações, e que este novo produto foi mais eficiente do que a bixina padrão em seqüestrar o DPPH[•] do meio. Como o ácido ascórbico é um potente agente antioxidante e a amostra da bixina sem modificação mostrou possuir pouca habilidade de seqüestro de radicais livres, pode-se supor que esta transformação foi benéfica para a molécula da bixina e que pode ser atribuída à porção do ácido ascórbico que se uniu à molécula de bixina.

O último carotenóide a ter sua atividade seqüestradora do radical livre DPPH foi o etil éster do ácido apocarotenóico (figura 67). Os valores obtidos para a diminuição da absorbância em 515 nm mostram que 26 μ moles/L dessa substância foram capazes de reduzir 55% do DPPH presente, o que é 27% a menos do que a amostra da astaxantina (utilizando uma concentração cerca de 3 vezes maior).

FIGURA 67 – CONSUMO DO RADICAL DPPH* PELO ETIL ÉSTER DO ÁCIDO APOCAROTENÓICO



Tanto o radical livre (80 $\mu\text{moles/L}$) quanto o antioxidante estavam solubilizados em solução etanólica. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro após 20min de reação (item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos), utilizando como controle do experimento a amostra de DPPH* sem adição e nenhum antioxidante. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes \pm desvio-padrão. O gráfico inserido na figura representa a porcentagem de DPPH* consumido.

Os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com a afirmação feita por WOODALL *et al.* (1997) de que qualquer reação envolvendo o sistema de duplas ligações conjugadas, em particular a adição de radicais peroxil ou a captura de elétrons pelo cromóforo, deve ser similar para os carotenóides que possuem a mesma estrutura básica (β -caroteno, zeaxantina e isozeaxantina). Claramente, a influência da presença e da posição do grupo OH na posição 4 modifica a reatividade do carotenóide. Este fato sugere que algum outro fator além da adição do radical livre a cadeia poliênica ou a captura do elétron pelo cromóforo esteja envolvido. A cantaxantina, astaxantina e a isozeaxantina todos possuem grupos substituintes em C_4 e C_4' , enquanto o β -caroteno e a zeaxantina não os possuem. As

posições C₄ e C₄', alílicas ao cromóforo, são posições reativas que rapidamente sofrem desidrogenação e também hidroxilação. Realmente, pode-se observar que a astaxantina e a cantaxantina que possuem estruturas bastante similares tiveram suas taxas de atividade antioxidante também parecidas.

A atividade aniquiladora de radicais peroxil mais acentuada da astaxantina e da cantaxantina pode ser atribuída ao grupo oxo na posição 4 ou 4' do anel ioneno, que pode ajudar a reduzir a densidade eletrônica no interior da cadeia carbônica e aumentar a estabilidade geral do radical carotenóide. Da mesma forma, a abstração do átomo do hidrogênio destas posições está reduzida nestes carotenóides (comparados ao β -caroteno), tornando-os menos susceptíveis a destruição durante a reação com radicais peroxil (PALACE *et al.*, 1999).

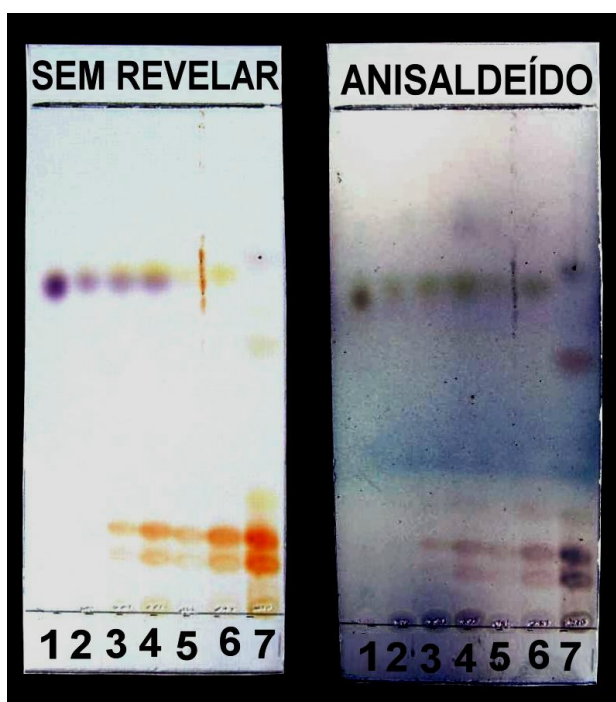
A astaxantina também demonstrou ser equipotente à cantaxantina e aproximadamente 50% mais efetiva do que o β -caroteno e a zeaxantina na prevenção da peroxidação em soluções químicas. Em modelos membranares, a astaxantina parece ser mais efetiva como seqüestrador de radicais peroxil do que o β -caroteno e é mais eficiente em atrasar o início da peroxidação lipídica do que a cantaxantina, zeaxantina ou β -caroteno. De fato, a astaxantina é capaz de completamente suprimir a reação em cadeia do radical e de acompanhar a demanda de oxigênio de uma maneira dose-dependente em um sistema liposomal (CARDOUNEL *et al.*, 2003).

4.5.1.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada é uma técnica bastante útil quando se trabalha com amostras coloridas. Na reação do DPPH[•] com carotenóides, pode-se observar o que acontece com cada um dos componentes da reação e se existe a formação de novos produtos coloridos ou não, neste último caso com a utilização de reveladores cromogênicos. Na figura 68, estão apresentadas as cromatoplasmas das amostras de astaxantina após reação com o DPPH[•].

Pode ser visto que à medida que a concentração de astaxantina no meio reacional aumenta, o DPPH[•] vai sendo consumido até o seu total desaparecimento. Isto já acontece em concentrações acima de 18 $\mu\text{moles/L}$ de astaxantina. O carotenóide, entretanto, parece permanecer intacto durante o processo de reação quando são utilizadas concentrações maiores do mesmo. Em concentrações pequenas (até 5 $\mu\text{moles/L}$) ele aparente e proporcionalmente é consumido na reação.

FIGURA 68 – MONITORAMENTO CROMATOGRÁFICO DA REAÇÃO ENTRE ASTAXANTINA E RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH



A cromatografia foi realizada em cromatoplacas de sílica-gel 60 e utilizou como fase móvel o solvente tolueno/acetato de etila/acetona (87:7:6). As anotações de SEM REVELAR e ANISALDEÍDO representam as cromatoplacas analisadas sem nenhum tipo de revelação e reveladas com anisaldeído sulfúrico à quente. A legenda numérica representa as seguintes condições: 1 = DPPH[•] 80 $\mu\text{moles/L}$; 2 = astaxantina 1,3 $\mu\text{moles/L}$ + DPPH[•] 80 $\mu\text{moles/L}$; 3 = astaxantina 2,7 $\mu\text{moles/L}$ + DPPH[•] 80 $\mu\text{moles/L}$; 4 = astaxantina 4,8 $\mu\text{moles/L}$ + DPPH[•] 80 $\mu\text{moles/L}$; 5 = astaxantina 6,4 $\mu\text{moles/L}$ + DPPH[•] 80 $\mu\text{moles/L}$; 6 = astaxantina 8 $\mu\text{moles/L}$ + DPPH[•] 80 $\mu\text{moles/L}$ e 7 = astaxantina 8 $\mu\text{moles/L}$. As amostras foram aplicadas 20min após a reação (item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos).

Quando se analisam as amostras de diferentes concentrações de bixina em reação com o DPPH[•], pode-se observar que algo distinto acontece. A bixina é consumida pelo DPPH[•] e este permanece quase que inalterado, exceto no extremo

superior de concentração (figura 69). Estes dados estão em acordo com os obtidos no experimento de espectrofotometria realizado anteriormente.

FIGURA 69 - MONITORAMENTO CROMATOGRÁFICO DA REAÇÃO ENTRE BIXINA E RADICAL LIVRE ESTÁVEL DPPH



A cromatografia foi realizada em cromatoplasas de sílica-gel 60 e utilizou como fase móvel o solvente tolueno/acetato de etila/acetona (87:7:6). As anotações de SEM REVELAR e ANISALDEÍDO representam as cromatoplasas analisadas sem nenhum tipo de revelação e reveladas com anisaldeído sulfúrico à quente. A legenda numérica representa as seguintes condições: 1 e 8 = bixina 13,2 $\mu\text{moles/L}$; 2 e 9 = DPPH $^{\bullet}$ 80 $\mu\text{moles/L}$; 3 = bixina 1,2 $\mu\text{moles/L}$ + DPPH $^{\bullet}$ 80 $\mu\text{moles/L}$; 4 = bixina 2,5 $\mu\text{moles/L}$ + DPPH $^{\bullet}$ 80 $\mu\text{moles/L}$; 5 = bixina 3,9 $\mu\text{moles/L}$ + DPPH $^{\bullet}$ 80 $\mu\text{moles/L}$; 6 = bixina 5,1 $\mu\text{moles/L}$ + DPPH $^{\bullet}$ 80 $\mu\text{moles/L}$; 7 = bixina 6,5 $\mu\text{moles/L}$ + DPPH $^{\bullet}$ 80 $\mu\text{moles/L}$. As amostras foram aplicadas 20min após a reação (item 3.2.5.1.1 de Material e Métodos).

4.5.2 Determinação da estequiometria da reação DPPH $^{\bullet}$ /antioxidante

Em testes usuais com o DPPH $^{\bullet}$ para acessar rapidamente a habilidade de substâncias antioxidantes em transferir prótons livres para compostos radicais, o DPPH $^{\bullet}$ é tipicamente caracterizado pelo seu valor de CE₅₀ (concentração necessária para reduzir 50% do DPPH $^{\bullet}$) ou a sua estequiometria (número de moléculas de DPPH $^{\bullet}$ reduzidas por uma molécula de antioxidante) (GOUPY *et al.*, 2003).

Como em alguns dos experimentos realizados não se atingiu a porcentagem

de 50% de redução do DPPH[•], será considerada para efeito de cálculos de estequiometria a concentração do carotenóide que obteve o maior grau de diminuição da absorbância das soluções das amostras após a reação (Cn). A estequiometria (σ , número de moléculas de DPPH[•] reduzidas por uma molécula de antioxidante), foi definida pela equação 2 (ver Material e Métodos). Os dados obtidos destes cálculos dão a estequiometria da reação apenas para a concentração escolhida e estão expostos na tabela 3.

TABELA 3 – VALORES DE PROPORCIONALIZAÇÃO E ESTEQUIOMÉTRICA NA REAÇÃO ENTRE CAROTENÓIDES E DPPH[•]

AMOSTRA	CE _n (μmoles/L)	ESTEQUIOMETRIA ^b	ESTEQUIOMETRIA ^c
Astaxantina 1*	8 (74,2%)	7,42 ± 0,008	8,55 ± 0,007
Astaxantina 4**	6,6 (95,7%)	11,6 ± 0,002	91,61 ± 0,005
Astaxantina 5**	2,4 (83,8%)	27,9 ± 0,002	35,96 ± 0,00007
Astaxantina 6**	2 (76,1%)	30,45 ± 0,003	48,38 ± 0,01
Bixina 1*	13,2 (12,6%)	0,79 ± 0,013	0,91 ± 0,01
Bixina 4**	1,3 (42,6%)	28,75 ± 0,002	40,77 ± 0,001
Bixina 5**	6,1 (49,4%)	6,47 ± 0,004	8,25 ± 0,0015
Bixina 6**	0,36 (95,1%)	440,58 ± 0,0005	862,43 ± 0,002
Cantaxantina*	15,3 (100%)	5,23 ± 0,003	7,00 ± 0,008
Etil Éster Ac. A*	26,1 (55%)	1,68 ± 0,006	1,72 ± 0,017
Licopeno*	1,1 (12,3%)	8,9 ± 0,003	8,2 ± 0,0008
Trolox C*	74,8 (91,6%)	0,97 ± 0,002	3,16 ± 0,01

Cn = concentração do antioxidante testado que reduz a maior parte da concentração inicial do DPPH. O valor entre parênteses indica a porcentagem de DPPH[•] consumida;

b = o valor de σ diz respeito ao número de moléculas de DPPH[•] reduzidas por 1 molécula de substância antioxidante ± desvio-padrão,

c = relação estequiométrica obtida através da inclinação da reta ± desvio-padrão;

* refere-se à amostra padrão, sem nenhum tipo de tratamento;

** refere-se às amostras que sofreram modificação enzimática (4=tratamento com NOVOZYME 435[®], 5 = tratamento com LIPOZYME TL IM[®] e 6=tratamento com lipase bovina).

Para que se possa ter uma idéia da estequiometria geral da reação (envolvendo todas as concentrações utilizadas), foi traçado um gráfico da porcentagem de redução do DPPH* *versus* a concentração do carotenóide – ANEXO III, pois através do cálculo da equação da reta de melhor ajuste (ou linha de tendência) obtém-se o valor numérico da inclinação da reta (distância vertical dividida pela distância horizontal entre dois pontos quaisquer na linha, que é a taxa de mudança ao longo da linha de regressão). Este parâmetro é utilizado como um indicador da estequiometria da reação (NOMURA *et al.*, 1997).

Segundo ARNAO (2000), a reação de oxido-redução que acontece entre o Trolox C e o DPPH* possui um estequiometria de 2:1 (radical cromógeno:antioxidante). Os dados obtidos neste experimento mostram que a concentração mais eficiente de Trolox C utilizada (74,9 μ moles/L) revelou uma estequiometria de reação de apenas 0,97. Entretanto, quando o parâmetro foi analisado pelo valor da inclinação da reta, a estequiometria se alterou para 3,16. Pode-se ser observado que para aquelas substâncias que apresentaram um perfil de redução do radical livre mais linear, as duas formas para o cálculo da estequiometria da reação resultaram em valores muito próximos (por exemplo: astaxantina 1, bixina 1, etil éster do ácido apocarotenóico e o licopeno). Nos outros casos, a redução do radical livre parece ter atingido um equilíbrio, com a presença de vários pontos representando a mesma faixa de consumo do DPPH.

A análise da estequiometria da reação entre o radical livre DPPH e cada substância antioxidante testada revelou que a amostra da bixina modificada pela ação da lipase de origem foi a que apresentou a melhor eficiência (estequiometria média de 651,5:1). Entretanto, a cantaxantina que foi o único carotenóide que conseguiu reduzir por completo o DPPH mostrou ter uma estequiometria de apenas 5,23:1. O licopeno e a bixina foram as amostras que mostraram a menor capacidade de reduzir o radical DPPH, mas ao se comparar a estequiometria das duas reações observa-se que o licopeno consegue consumir cerca de 11 vezes mais moléculas de

DPPH do que a bixina. Isto pode significar que a baixa atividade do licopeno encontrada pode ser devida simplesmente a pouca quantidade de amostra ensaiada nesta faixa etária de concentração.

4.5.3 Ensaio de Equivalência da Capacidade Antioxidante Total do Trolox C relativa ao DPPH - TEAC_{DPPH}

Este método é baseado na capacidade de diferentes compostos em seqüestrar o cátion radical ABTS^{•+} (sal diamônico do ácido 2,2'-azonobis-3-etilbenzotiazolil-6-sulfônico) comparada com um antioxidante padrão (Trolox C). É possível obter-se uma curva dose-resposta com o antioxidante padrão (hidrofílico ou lipofílico) para quantificar a atividade antioxidante. No caso do Trolox, sabe-se que um mol de Trolox é capaz de seqüestrar dois moles de ABTS^{•+} (ARNAO *et al.*, 2001). Em outro trabalho desenvolvido por ARNAO (2000), percebe-se que a estequiometria da reação com o DPPH[•] é a mesma. Tanto o cátion radical ABTS quanto o DPPH[•] possuem a relação molar padrão do radical cromógeno/antioxidante padrão sendo de 2:1. Além do mais, outro estudo relacionando quantitativamente a relação entre estrutura e atividade no comportamento antioxidante de carotenóides já descreveu que os achados do ensaio de TEAC estão correlacionados com os achados de outros ensaios de caracterização antioxidante dos carotenóides, como por exemplo, a degradação destes por vários tipos de radicais. Esta observação suporta o uso do ensaio de TEAC para quantificar o potencial químico antioxidante intrínseco de compostos e ilustra que os resultados obtidos com o TEAC no seqüestro do cátion radical ABTS estão em concordância com os resultados obtidos do seqüestro de outros tipos de radicais (TYRAKOWSKA *et al.*, 1999).

Já se é sabido que a medida de compostos lipossolúveis em ensaios de TEAC possui uma forte dependência do solvente utilizado. Estudos feitos com o β -caroteno indicam que a sua capacidade de seqüestrar o radical livre ABTS^{•+} é bastante variada. Quando utilizado o tetrahidrofurano como solvente, este

carotenóide mostrou o maior valor de TEAC enquanto nenhuma capacidade antioxidante significativa pode ser demonstrada quando ele estava dissolvido em acetona (BAST *et al.*, 1998; BERG *et al.*, 1999).

A hierarquia da atividade antioxidante de carotenóides foi testada com o radical livre ABTS^{•+} em comparação com um padrão de antioxidante - Trolox C. Todos os carotenóides estudados mostraram diferentes habilidades em seqüestrar o radical ABTS^{•+} (valores de TEAC) sendo o licopeno ($2,9 \pm 0,15$) mais eficiente que o β -caroteno ($1,9 \pm 0,1$), que por sua vez foi mais eficiente que o seu isômero α -caroteno ($1,3 \pm 0,04$). Outros carotenóides também foram testados e apresentaram a seguinte ordem de eficiência: luteína ($1,5 \pm 0,1$); zeaxantina ($1,4 \pm 0,04$); astaxantina ($0,03 \pm 0,03$) e cantaxantina ($0,02 \pm 0,02$) (MILLER, 1996).

Com o objetivo de comparar os modelos carotenóides de antioxidantes com o Trolox C, escolheu-se uma concentração comum às duas substâncias testadas e calculou-se o TEAC_{DPPH} dos carotenóides que estão listados na tabela 4.

Neste trabalho ficou evidenciado que a amostra cantaxantina, foi mais eficaz do que o próprio Trolox C, assim como os exemplares da astaxantina que foram tratados com a enzima NOVOZYME 435 e a bixina tratada com a lipase bovina. Surpreendentemente, esta amostra se mostrou 5 vezes mais eficiente que o padrão testado. As amostras de astaxantina submetidas ao tratamento com a lipase bovina e a bixina tratada com a NOVOZYME 435 foram equipotentes em relação ao Trolox C. O etil éster do ácido apocarotenóico foi equipotente ao Trolox C e as demais amostras mostraram-se com menos habilidade em seqüestrar este radical livre. Curiosamente, nenhuma das amostras testadas com a LIPOZYME TL IM foram mais eficientes do que o padrão de antioxidante.

TABELA 4 – TEAC_{DPPH} DOS CAROTENÓIDES ESTUDADOS

CAROTENÓIDE	TEAC _{DPPH}
Astaxantina 1*	0,2
Astaxantina 4**	4,2
Astaxantina 5**	0,38
Astaxantina 6**	1,67
Bixina 1*	0,24
Bixina 4**	1,14
Bixina 5**	0,32
Bixina 6**	4,94
Cantaxantina*	1,66
CY*	0,65
Licopeno*	0,03

* refere-se à amostra padrão, sem nenhum tipo de tratamento;

** refere-se às amostras que sofreram modificação enzimática (4 = tratamento com NOVOZYME 435[®], 5 = tratamento com LIPOZYME TL IM[®] e 6 = tratamento com lipase bovina).

Os ensaios do tipo TEAC medem a capacidade antioxidante de um composto somada com aquela dos seus produtos de reação, e estes podem ter considerável contribuição para o valor do TEAC. Sabe-se que esta contribuição não é similar para todos os antioxidantes. Desta forma, o efeito produzido pelos produtos de reação impedem que o TEAC seja utilizado para a construção da relação estrutura / atividade (REA); em estudos de REA a atividade está relacionada a uma estrutura apenas (ARTS *et al.*, 2004), e alguns casos fica bastante difícil de se saber se o efeito obtido é devido somente à substância testada ou se ele está sendo influenciado pela formação de outros compostos que também podem reagir com o radical livre.

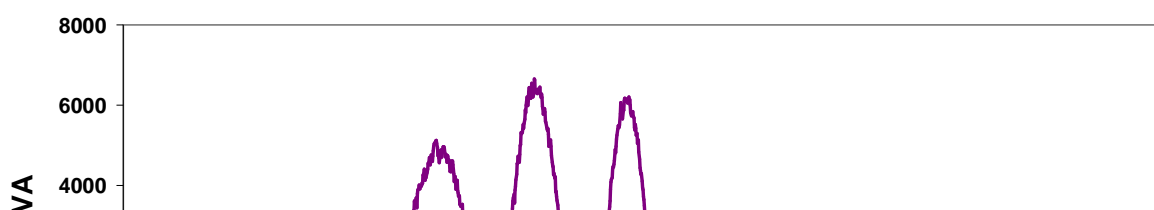
4.5.4 Ressonância Paramagnética de Elétrons

A espectroscopia de ressonância paramagnética de elétrons (RPE) é uma técnica espectroscópica que serve para detectar a presença de elétrons desemparelhados nas amostras em análise. Ela pode fornecer informações estruturais e dinâmicas, mesmo para processos físicos, ou químicos, em andamento. Ela trata do processo de absorção da radiação eletromagnética, na faixa das microondas, por íons ou moléculas paramagnéticas, com ao menos um elétron desemparelhado, e na presença de um campo magnético (MANGRICH, 2002).

A RPE oferece várias vantagens sobre as determinações colorimétricas. Além disso, os radicais livres possuem espectros bem definidos, os quais permitem que eles sejam claramente resolvidos de outros radicais intermediários que podem se formar durante o processo. A técnica *per se* é bastante sensível, permitindo a detecção a níveis inferiores que o micromolar; as análises podem ser feitas em soluções túrbidas ou altamente coloridas, o que representa uma característica de muitas amostras obtidas na forma de extratos vegetais (GARDNER *et al.*, 2000).

Um dos padrões mais vastamente utilizados na ressonância paramagnética de elétrons é o DPPH[•]. Este radical já é bem caracterizado em campos e frequências baixos. Quando em solução pode-se observar a formação de um quinteto hiperfino derivado dos dois núcleos de nitrogênio (KRZYSTEK *et al.*, 1997). O DPPH é um radical estável que resulta em um espectro de ressonância paramagnética de elétrons bem caracterizado (JE *et al.*, 2004). O experimento realizado neste trabalho pôde-se confirmar este perfil de espectro (figura 70).

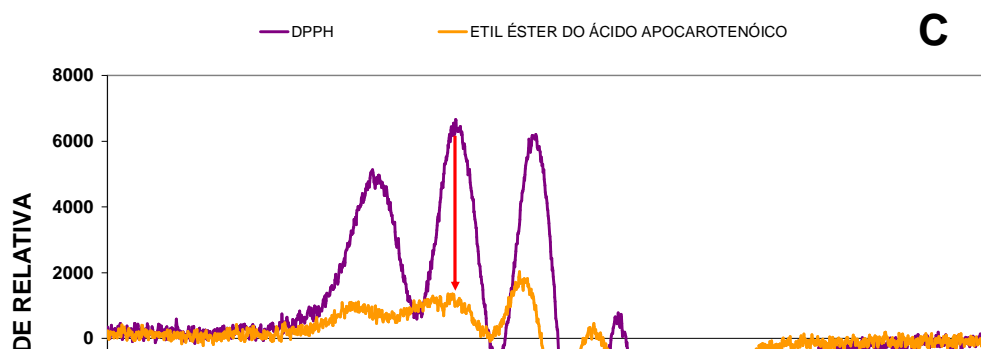
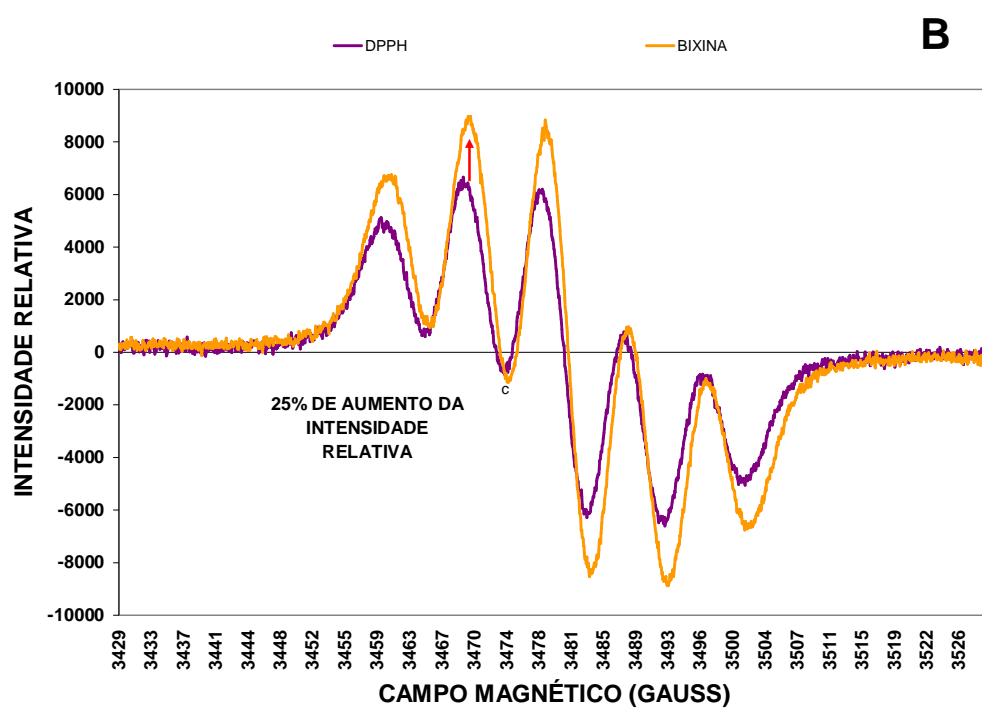
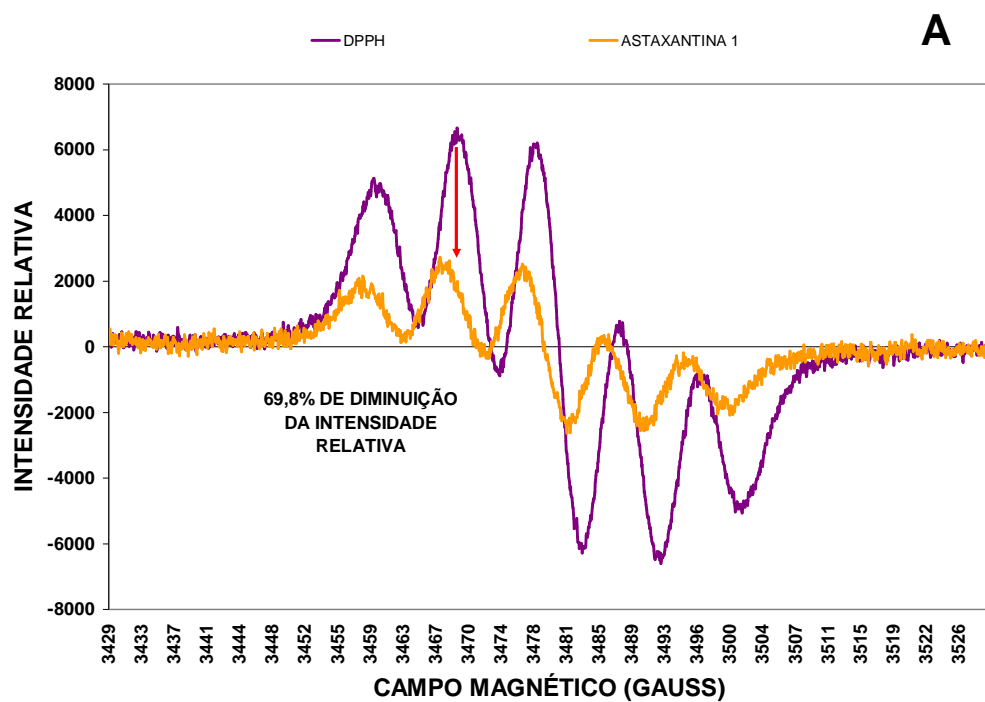
FIGURA 70 – ESPECTRO DE RPE DO RADICAL LIVRE DPPH

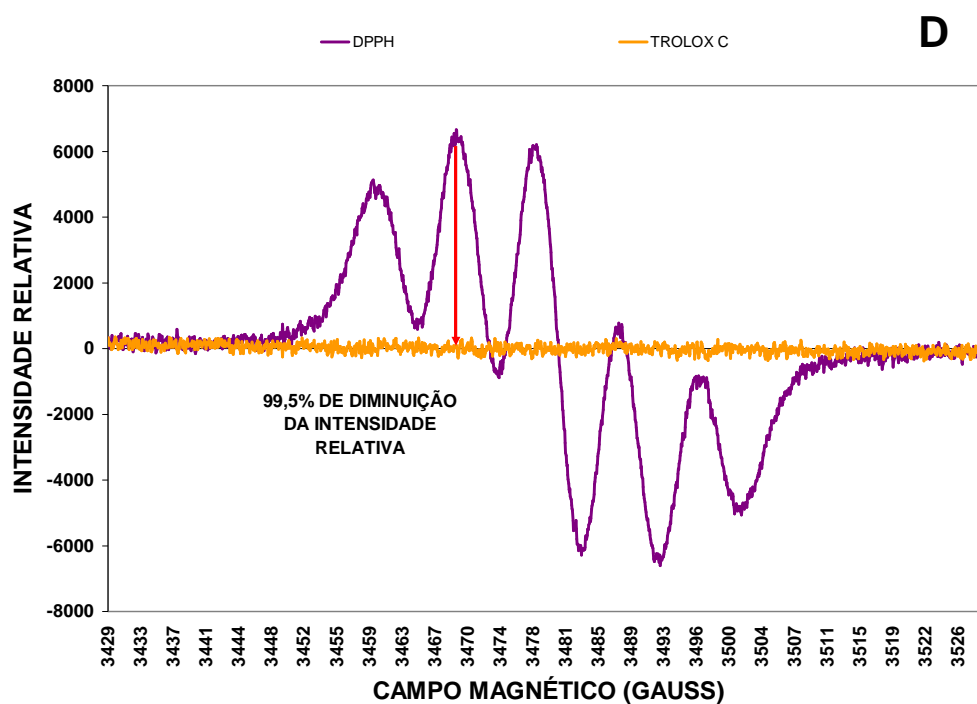


O espectro foi obtido nas seguintes condições: baixa temperatura (77°K) de nitrogênio líquido, em espectrofotômetro Bruker ESP 300E operando em Banda-X (9,5 GHz) empregando 100 kHz de frequência de modulação do campo magnético. O DPPH[•] estava em solução etanólica na concentração de 80 µmoles/L.

Da mesma forma que o espectro acima foi obtido, também foram realizadas medidas do espectro do DPPH[•] após reação frente aos vários carotenóides estudados (figura 71). Estas reações seguiram o protocolo especificado em Material e Métodos e as amostras em solução etanólica que foram submetidas a ressonância paramagnética de elétrons estavam em uma concentração final de 80 µmoles/L do radical DPPH[•]. Elas só foram ensaiadas após o período de 30 minutos de contato, para que se tivesse certeza de que toda a reação havia ocorrido. A diminuição da intensidade relativa dos picos característicos do espectro do DPPH[•] é sinal de que o carotenóide foi capaz de consumir este radical livre.

FIGURA 71 – ESPECTROS DE RPE DAS AMOSTRAS DE CAROTENÓIDES APÓS REAÇÃO COMO O RADICAL DPPH[•]





O espectro foi obtido nas seguintes condições: baixa temperatura (77°K) de nitrogênio líquido, em espectrofotômetro Bruker ESP 300E operando em Banda-X (9,5 GHz) empregando 100 kHz de frequência de modulação do campo magnético. O DPPH[•] estava em solução etanólica na concentração de 80 µmoles/L. A solução proveniente da reação entre o Trolox C e o DPPH[•], também em etanol, foi lida após 30min.

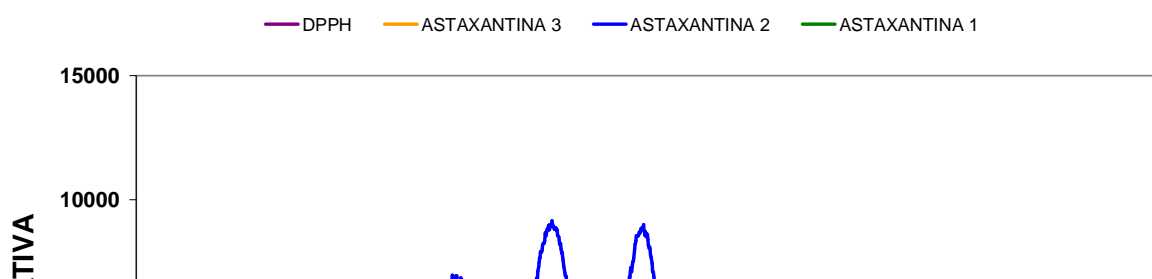
Como pode ser visto nas figuras acima, o Trolox C – antioxidante utilizado como padrão em todas as análises, foi capaz de consumir totalmente o radical

DPPH. O espectro característico do radical, um quinteto de sinais, foi totalmente anulado e transformada em uma única linha reta. As amostras de astaxantina padrão e etil éster do ácido apocarotenóico também foram capazes de consumir com este radical, mas em proporções diferentes. As amostras de bixina padrão, licopeno e β -caroteno aparentemente não foram capazes de degradar este radical.

Quando se faz uma análise mais profunda destes dados, examinando especificamente a diminuição da intensidade relativa do sinal referente ao segundo pico (3460,216 Gauss), é possível ter uma noção melhor do que está acontecendo. A diminuição provocada neste valor de campo magnético pelo Trolox C foi de 96,48%, comprovando que esta substância é realmente capaz de consumir com todo o radical disponível no meio reacional. O etil éster do ácido apocarotenóico foi, das amostras que não sofreram nenhum tipo de modificação, o que conseguiu aproximar-se mais do Trolox C. Ele causou um efeito inibidor do DPPH[•] de 84,90%, seguido pela astaxantina (64,75%). As demais amostras tiveram um efeito bem menos potente, como pode ser visto com o licopeno (11,35%). Interessantemente, a bixina não foi capaz de consumir este radical e, pelo contrário, parece ter exercido um efeito pró-oxidante, pois aumentou a intensidade relativa do pico nesta faixa de campo magnético.

Tendo em mãos os dados espectrofotométricos de que a astaxantina e a bixina tinham comportamentos diferentes em relação ao seqüestro do DPPH[•], investigou-se também se as alterações químicas realizadas nestas amostras teriam alguma influência na atividade antioxidantes destes compostos (figura 72).

FIGURA 72 – ESPECTROS DE RPE DAS AMOSTRAS DE ASTAXANTINA APÓS ACETILAÇÃO E REAÇÃO COM O RADICAL LIVRE DPPH



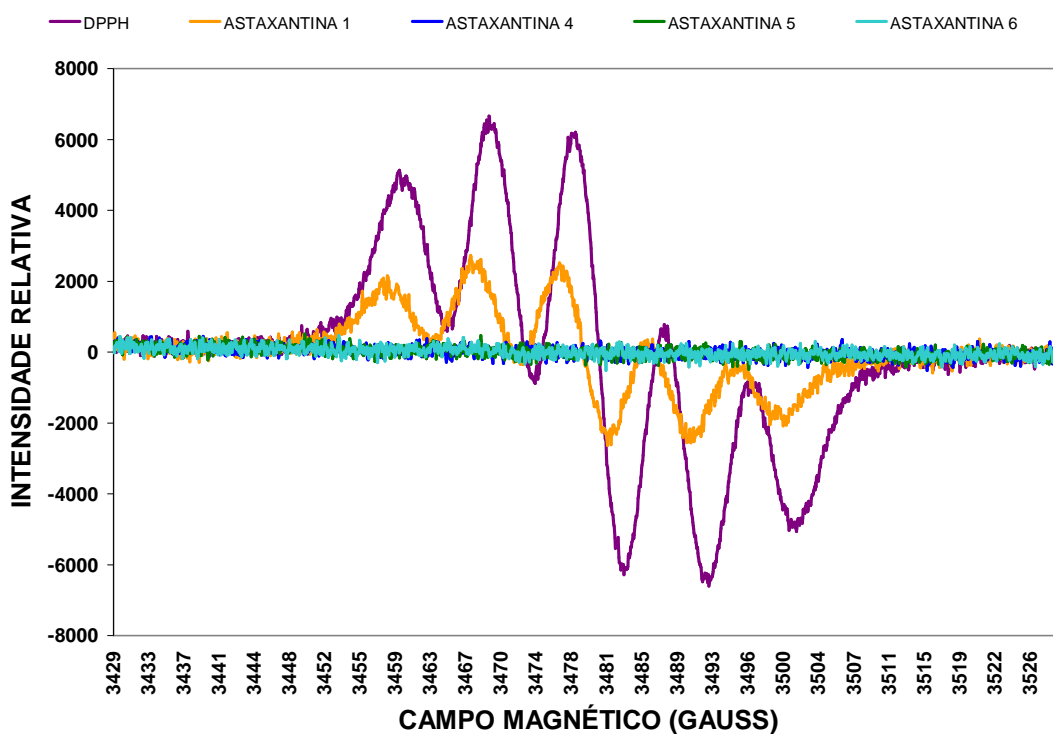
O espectro foi obtido nas seguintes condições: baixa temperatura (77°K) de nitrogênio líquido, em espectrofotômetro Bruker ESP 300E operando em Banda-X (9,5 GHz) empregando 100 kHz de frequência de modulação do campo magnético. O DPPH[•] estava em solução etanólica na concentração de 80 μmoles/L. A solução proveniente da reação entre a astaxantina padrão (astaxantina 1), astaxantina acetilada apenas com anidrido acético (astaxantina 2) e astaxantina acetilada com anidrido acético e piridina (astaxantina 3) e o DPPH[•], também em etanol, foram lidas após 30min.

Pode ser identificado que a acetilação da amostra da astaxantina trouxe uma perda da sua atividade antioxidante. A amostra que foi submetida a acetilação apenas com anidrido acético obteve picos maiores que o próprio DPPH[•] e aquela que foi acetilada com o anidrido e piridina teve uma capacidade menor que a amostra original (31,56% apenas). Como a acetilação ocorre nos grupamentos OH das moléculas, pode ser que este grupo funcional seja importante para a capacidade antioxidante da amostra de astaxantina e que quando ela perde este grupo, não possa mais exercer esta atividade. A porcentagem residual na amostra acetilada com piridina pode ser devido ao processo de acetilação incompleto da amostra.

Em relação às amostras de bixina, a única que conseguiu realizar o seqüestro do DPPH[•] foi a amostra modificada com a piridina (57,77%). As demais amostras de bixina não foram capazes de realizar tal ação.

O segundo tipo de modificação realizado com as amostras padrão de astaxantina e bixina foi a enzimática. Três tipos de enzimas foram testados e a ação de todas, em qualquer um dos carotenóides ensaiados, mostraram uma eficiência maior que o próprio Trolox C em consumir o DPPH^{*} (figura 73 - astaxantina e 74 - bixina).

FIGURA 73 – ESPECTROS DE RPE DAS AMOSTRAS DE ASTAXANTINA APÓS MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA E REAÇÃO COM O RADICAL LIVRE DPPH

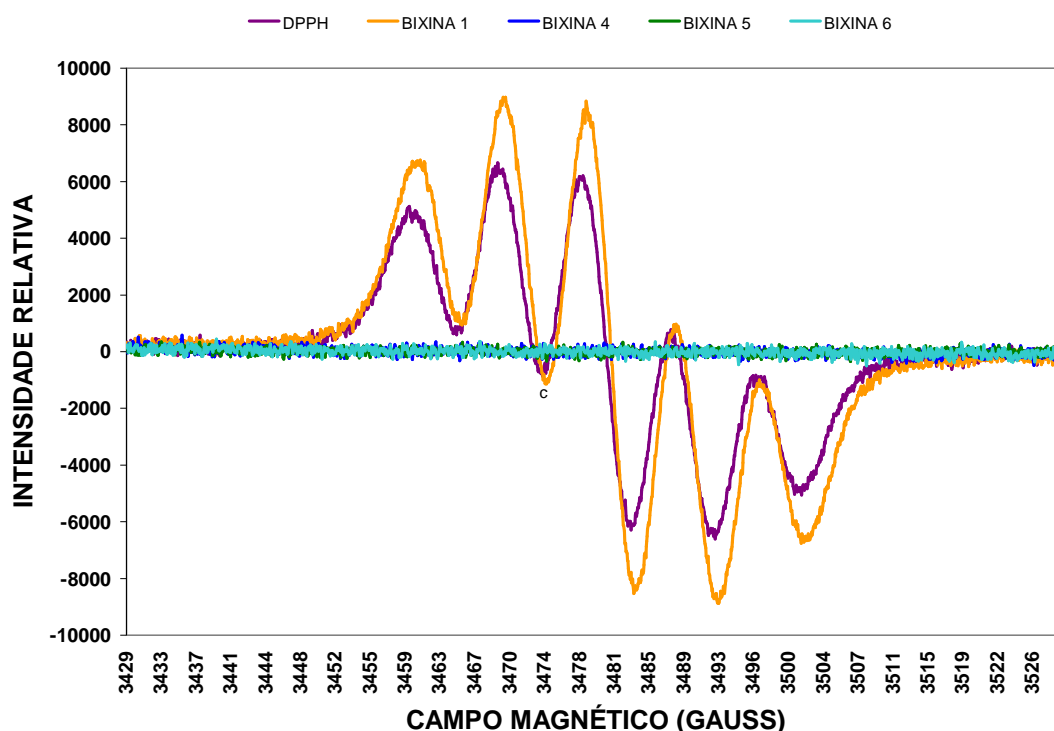


O espectro foi obtido nas seguintes condições: baixa temperatura (77°K) de nitrogênio líquido, em espectrofotômetro Bruker ESP 300E operando em Banda-X (9,5 GHz) empregando 100 kHz de frequência de modulação do campo magnético. O DPPH^{*} estava em solução etanólica na concentração de 80 μ moles/L. A solução proveniente da reação entre a astaxantina padrão (astaxantina 1), astaxantina tratada com a lipase NOVOZYME 435 (astaxantina 4), astaxantina tratada com a lipase LIPOZYME TL IM (astaxantina 5) e com a lipase bovina (astaxantina 6) e o DPPH^{*}, também em etanol, foram lidas após 30min.

As modificações feitas na amostra de astaxantina tiveram uma eficiência de 99,54% para a tratada com a enzima Novozyme 435[®], de 97,44% para a tratada com a lipase bovina e de 100% com a LIPOZYME TL IM[®]. Em relação às amostras

de bixina modificadas, a tratada com a enzima bovina teve uma eficiência de 99% e as demais conseguiram seqüestrar 100% do DPPH*.

FIGURA 74 – ESPECTROS DE RPE DAS AMOSTRAS DE BIXINA APÓS MODIFICAÇÃO ENZIMÁTICA E REAÇÃO COM O RADICAL LIVRE DPPH



O espectro foi obtido nas seguintes condições: baixa temperatura (77°K) de nitrogênio líquido, em espectrofotômetro Bruker ESP 300E operando em Banda-X (9,5 GHz) empregando 100 kHz de frequência de modulação do campo magnético. O DPPH* estava em solução etanólica na concentração de 80 μ moles/L. A solução proveniente da reação entre a bixina padrão (bixina 1), bixina tratada com a lipase NOVOZYME 435 (bixina 4), bixina tratada com a lipase LIPOZYME TL IM (bixina 5) e com a lipase bovina (bixina 6) e o DPPH*, também em etanol, foram lidas após 30min.

Com a respectiva análise de todos os resultados apresentados neste capítulo, pode-se chegar às conclusões que estarão descritas no próximo item. Mas fica claro que os relatos de vários estudos na literatura, que consideram algumas características dos carotenóides como essenciais para caracterizar a sua atividade antioxidante estão em concordância com este trabalho. Dentre estas características se pode citar: a estrutura da molécula (tamanho, forma, natureza – lipofílica ou não, a posição, e o número de grupos substituintes) e a concentração do carotenóide

(YOUNG & LOWE, 2001).

5 CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos neste trabalho pode-se chegar às seguintes conclusões:

MODIFICAÇÃO POR MÉTODOS QUÍMICOS DE CAROTENÓIDES:

- ✓ A derivatização da astaxantina por métodos químicos (acetilação) demonstrou ser um processo viável, de fácil execução e com resultados positivos quando realizada na presença de piridina e anidrido acético;
- ✓ A acetilação realizada apenas com anidrido acético na amostra de astaxantina provocou alterações no perfil espectrofotométrico (diminuição da absorbância em etanol) e do perfil de migração em cromatografia de camada delgada (alteração do valor do fator de retenção da amostra para valores mais baixos e o desaparecimento de uma das bandas características da amostra). Quando a técnica de acetilação foi adicionada de piridina, a diminuição na absorbância em etanol foi 1,3 vezes menor do que a conseguida com o anidrido acético apenas. Outra diferença encontrada foi a migração das bandas cromatográficas, que se mostraram com um fator de retenção maior.
- ✓ A acetilação da amostra de astaxantina foi confirmada pela análise por cromatografia líquida de alta eficiência. A astaxantina tida como acetilada teve seu tempo de retenção alterado. Após ser submetida a tratamento com hidróxido de sódio 1M (para a remoção dos grupos acetil) esta retornou ao perfil da amostra original (sem acetilação);

MODIFICAÇÃO POR MÉTODOS FÍSICOS DE CAROTENÓIDES

- ✓ As modificações realizadas por métodos físicos nas amostras de astaxantina e de bixina foram bem sucedidas. Quando essa alteração foi

realizada pela complexação com ciclodextrinas, observou-se que tanto a bixina quanto a astaxantina foram capazes de formar complexos de inclusão com a β -ciclodextrina e, desta forma, tornaram-se solúveis em água;

- ✓ A processo de sonicação nas amostras de carotenóides complexadas com a β -ciclodextrina provoca um aumento de cerca de 3 vezes na hidrossolubilidade do complexo. No entanto, a sonicação só é válida quando realizada após a formação do complexo de inclusão e um único ciclo de sonicação é suficiente para atingir o máximo de solubilização do complexo;
- ✓ A adição de etanol ao complexo já formado entre carotenóides e β -ciclodextrina não provoca alterações na hidrossolubilidade do mesmo. Já no complexo com a bixina, o etanol provoca uma diminuição de até 70% na sua solubilidade;
- ✓ A re-adição de carotenóide ao complexo já formado provoca um aumento na hidrossolubilidade do mesmo, até a quantidade de 2,5 mg/ml. Após este valor as absorbâncias dos complexos tornam-se constantes;
- ✓ A re-adição de β -ciclodextrina ao complexo já formado não foi capaz de alterar a sua solubilidade em água;
- ✓ A complexação de carotenóides com a quitosana, bem como a formação de esférulas das amostras complexadas, foi realizada com sucesso. A melhor forma encontrada de secagem das esférulas formadas foi a liofilização, resultando em esférulas maiores e menos pesadas. A condição encontrada como ideal para a formação das esférulas dos complexos carotenóides/quitosana foi a presença de 8% de solução aniônica de pirofosfato de sódio e quando as amostras estavam solubilizadas em solução aquosa de ácido acético a 1%;

MODIFICAÇÃO POR MÉTODOS ENZIMÁTICOS DE CAROTENÓIDES

- ✓ A esterificação das amostras de astaxantina e de bixina na presença de ácido ascórbico (substrato da reação) resultou em diminuição dos valores de absorbância em etanol, quando foram testadas as lipases LIPOZYME TL IM[®] e a lipase de origem bovina.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

- ✓ A astaxantina foi capaz de seqüestrar cerca de 75% do radical livre DPPH• quando na concentração de 8 µmoles/L e analisada pelo método fotolorimétrico e cerca de 70% quando analisada pela técnica de ressonância paramagnética de elétrons. Quando este carotenóide foi submetido ao processo de acetilação, notou-se que a sua atividade antioxidante foi negativamente alterada. Já quando a modificação realizada na amostra padrão foi do tipo enzimática, esta habilidade foi aumentada com todas as enzimas testadas, chegando a 100% de consumo do radical com a enzima de origem bovina;
- ✓ A bixina foi pouco capaz de realizar o seqüestro do radical livre. As únicas situações em que esse resultado foi alterado, foram quando este carotenóide foi esterificado com as lipases (cerca de 98% de consumo do radical livre);
- ✓ Tanto o licopeno quanto o β-caroteno (ambos classificados como carotenos) não foram eficientes em seqüestrar o DPPH;
- ✓ A cantaxantina e o etil éster do ácido apocarotenóico demonstraram uma eficiência de 100% e de 55% respectivamente, neste processo;
- ✓ Quando os carotenóides em estudo foram comparados com o Trolox C (considerado como padrão de antioxidante) observou-se que as amostras de astaxantina e bixina modificadas enzimaticamente (com exceção da tratada com a lipase LIPOZYME TL IM[®]) e a amostra de

cantaxantina tiveram uma atividade antioxidante superior ao Trolox C. As demais amostras foram menos eficientes do que esse último.

Finalmente, pode-se concluir que as modificações feitas nas moléculas de astaxantina e de bixina foram capazes de alterar as suas propriedades biológicas e suas características estruturais. No caso da modificação química essa alteração se deu de forma negativa, prejudicando as atividades da astaxantina. As modificações físicas realizadas mostraram-se funcionar como estratégias para o melhor uso desses carotenóides junto às indústrias de alimentos e cosméticos e as modificações enzimáticas foram capazes de aumentar a atividade antioxidante destes compostos frente ao radical livre testado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, C. R. O. Química Organica I Anotações de Aula I Capítulo 4 Isomeria. Disponível em http://www.dequi.faelnquil.br/~croa/apostilas/organica_parte2.pdf Acesso em jul, 2004.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, v. 84, p. 551-562, 2004.
- ANTHONSEN, T.; HOFF, B. H. Resolution of derivatives of 1,2-propanediol with lipase B from *Candida antarctica*. Effect of substrate structure, medium, water activity and acyl donor on enantiomeric ratio. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 199-207, 1998.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.
- ARNAO, M. B.; CANO, A.; ACOSTA, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 73, p. 239-244, 2001.
- ARTS, M. J. T. J.; HAENEN, G. R. M. M.; VOSS, H. P.; BAST, A. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 45-49, 2004.
- BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M.; van den BERG, R. and van den BERG, H. Antioxidant effects of carotenoids. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 68, p. 399-403, 1998.
- BENDER, M. L.; KOMIYAMA, M. **Cyclodextrin Chemistry**. Ed. Springer, Berlin, 1978.
- BENDICH, A.; OLSON, J. A. Biological actions of carotenoids. **FASEB Journal**, v. 3, p. 1927-1932, 1989.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.
- BERG, R. van den.; HAENEN, G. R. M. M.; BERG, H. van den.; BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, v. 66, p. 511-517, 1999.
- BERTH, G.; DAUTZENBERG, H. The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 47, p. 39-51, 2002.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BODMEIER, R.; OH, K. H.; PRAMAT, Y. Preparation and evaluation of drug-containing chitosan beads. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 15, n. 9, p. 1475-1494, 1989.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH[•] free radical method. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 30, p. 609-615, 1997.

BOUVIER, F.; DOGBO, O.; CAMARA, B. Biosynthesis of the Food and Cosmetic Plant Pigment Bixin (Annatto). **Science**, v. 300, p. 2089-2091, 2003.

BRESSANI, R.; BARNÉON, F. P. E. de; BRABAM, J. E.; ELÍAS, L. G.; GÓMEZ-BRENES, R. Composicion química, contenido de aminoacidos y valor nutritivo de la proteína de semilla de achiote (*Bixa orellana*, L.). **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 33, n. 2, p. 356-376, 1983.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB Journal**, v. 9, p. 1551-1558, 1995.

BURTON, G. W. Antioxidant action of carotenoids. **Journal of Nutrition**, v. 119, n. 1, p. 109-111, 1989.

CAMBILLAU, C.; LONGHI, S.; NICOLAS, A.; MARTINEZ, C. Acyl glycerol hydrolases: inhibitors, interface and catalysis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 6, p. 449-455, 1996.

CAMPANA-FILHO, S. P.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M. R. Effects of sonication on the reactivity of chitin towards its heterogeneous deacetylation. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 51, p. 695-700, 2000.

CANELLA, K. M. N. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. A.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 7, p. 75-80, 2003.

CANTRELL, A.; McGARVEY, D. J.; TRUSCOTT, T. G.; RANCAN, F.; BÖHM, F. Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 412, p. 47-54, 2003.

CARDOUNEL, A. J.; DUMITRESCU, C.; ZWEIER, J. L.; LOCKWOOD, S. F. Direct superoxide anion scavenging by disodium disuccinate astaxanthin derivative: relative efficacy of individual stereoisomers versus the statistical mixture of stereoisomers by electron paramagnetic resonance imaging. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, p. 704-712, 2003.

CARERI, M.; ELVIRI, L.; MANGIA, A. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of β -carotene and xanthophylls. Validation of the analytical method. **Journal of Chromatography A**, v. 854, p. 233-244, 1999.

CHANG, K. L. B.; TSAI, G.; LEE, J.; FU, W. R. Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. **Carbohydrate Research**, v. 303, p. 327-332, 1997.

COHEN, L. A. A review of animal model studies of tomato carotenoids, lycopene, and cancer chemoprevention. **Exp. Biol. Med.**, v. 227, p. 864-868, 2002.

COLUMBIÉ, S.; TWEDDELL, R. J.; CONDORET, J. S.; MARTY, A. Water activity control: a way to improve the efficiency of continuous lipase esterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 6, n. 3, p. 362-368, 1998.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. de. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 863-873, 1999.

CRAMER, F.; SAENGER, W.; SPATZ, H. Inclusion complexes. XIX. The formation of inclusion compounds of α -cyclodextrin in aqueous solutions. Thermodynamics and kinetics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, n. 1, p.14-20, 1967.

CUROTTO, E.; AROS, F. Quantitative determination of chitosan and the percentage of free amino groups. **Analytical Biochemistry**, v. 211, p. 240-241, 1993.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.

DELICADO, E. N.; FERRER, A. S.; CARMONA, F. G. A kinetic study of the one-electron oxidation of Trolox C by the hydroperoxidase activity of lipoxygenase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1335, p. 127-134, 1997.

ECKERT, G. P. Disponível em <http://www.biozentrum.uni-frankfurt.de/Pharmakologie/index.html> acesso em mar, 2004.

FARIAS, R. N.; TORRES, M.; CANELA, R. Spectrophotometric determination of the positional specificity of nonspecific and 1,3-specific lipases. **Analytical Biochemistry**, v. 252, p. 186-189, 1997.

FAO. An overview of the global marketplace: competition between natural and synthetic products and legislation on food colorants. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/v8879e04.html>> Acesso em: nov.2003.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FINKELSHTEIN, E. I.; KRASNOKUTSKAYA, I. S.; VAKULOVA, L. A. Spectroscopy of carotenoids and its application to the investigation of autoxidation. **Journal of Molecular Structure**, v. 480-481, p. 569-571, 1999.

FIRACE. **Generalidades sobre o urucum.** Disponível em <http://www.firace.com.br/urucum.html> acesso em jun, 2002.

FONTANA, J. D.; CZECHUGA, B.; BONFIM, T. M. B.; CHOCIAI, M. B.; OLIVEIRA, B. H.; GUIMARÃES, M. F.; BARON, M. Bioproduction of carotenoids: the comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 121-125, 1996.

FRANCE-CHITINE. Disponível em <http://www.france-quitine.com/fab.e.htm> Acesso em: março, 2004.

FRANKEL, E. N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. **Food Chemistry**, v. 57, n. 1, p. 51-55, 1996.

GADRE, A.; RÜDIGER, V.; SCHNEIDER, H. J.; CONNORS, K. A. Binding of cyclodextrin to alicyclic and aromatic substrates: complex formation of α -, β - and γ -cyclodextrin with substituted cyclohexanecarboxylic acids and pjenylalkanoic acids. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 2, p. 236-243, 1997.

GARDNER, P. T.; WHITE, T. A. C.; McPHAIL, D. B.; DUTHIE, G. G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. **Food Chemistry**, v. 68, p. 471-474, 2000.

GIACOMETTI, J.; GIACOMETTI, F.; MILIN, E.; VASIC-RACKI, D. Kinetic characterization of enzymatic esterification in a solvent system adsorptive control of water with molecular sieves. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 921-928, 2001.

GOLDSTEIN, S.; MEYERSTEIN, D.; CZAPSKI, G. The Fenton Reagents. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 15, p. 435-445, 1993.

GOLPY, P.; DUFOUR, C.; LOONIS, M.; DANGLES, O. Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 615-622, 2003.

GORINSTEIN, S.; MARTIN-BELLOSO, O.; KATRICH, E.; LOJEK, A.; CIZ, M.; GLIGELMO-MIGUEL, N.; HARUENKIT, R.; PARK, Y. S.; JUNG, S. T.; TRAKHTENBERG, S. Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, p. 154-159, 2003.

GUNSTONE, F. D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 1535-1549, 1999.

HAGIWARA, A.; IMAI, N.; ICHIHARA, T.; SANO, M.; TAMANO, S.; AOKI, H.; YASUHARA, K.; KODA, T.; NAKAMURA, M.; SHIRAI, T. A thirteen-week oral toxicity study of annatto extract (*norbixin*), a natural food color extractes from the seed coat of annatto (*Bixa orellana* L.), in Sprague-Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1157-1164, 2003.

HALLAGAN, J. B.; ALLEN, D. C.; BORZELLECA, J. F. The safety and Regulatory Status of Food, Drug and Cosmetics Colour Additives Exempt from Certification. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 33, n. 6, p. 515-528, 1995.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 23, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Third Edition, Oxford university Press, 1996.

HANDELMAN, G. J. The envolving role of carotenoids in human biochemistry. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 818-822, 2001.

HART, D. J.; SCOTT, K. J. Development and evaluation of na HPLC method for the analysis of carotenoids in food, and the measurement of the carotenoid content of

vegetables and fruits commonly consumed in the UK. **Food Chemistry**, v. 54, p. 101-111, 1995.

HEBER, D.; LU, QING-YI. Overview of mechanisms of action of lycopene. **Exp. Biol. Med.**, v. 227, p. 920-923, 2002.

HENSLEY, K.; FLOYD, R. A. Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 397, n. 2, p. 377-383, 2002.

HIRAMATSU, M.; LIU, J.; EDAMATSU, R.; OHBA, S.; KADOWAKI, D.; MORI, A. Probucol scavenged 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals and inhibited formation of thiobarbituric acid reactive substances. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 16, n. 2, p. 201-206, 1994.

HUMEAU, C.; ROVEL, B.; GIRARDIN, M. Enzymatic esterification of bixin by L-ascorbic acid. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 165-168, 2000.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 2, p. 147-162, 1997.

JAKO, C.; COUTU, C.; ROEVER, I.; REED, D. W.; PELCHER, L. E.; COVELLO, P. S. Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. **Plant Science**, v. 163, p. 141-145, 2002.

JE, YOUNG-JAE.; PARK, PYO-JAM; KIM, SE-KWON. Free radical scavenging properties of hetero-chitooligosaccharides using an ESR spectroscopy. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 381-387, 2004.

JENNINGS, B. H.; AKOH, C. C. Lipase catalysed modification of fish oil to incorporate capric acid. **Food Chemistry**, v. 72, p. 273-278, 2001.

KAMIL, J. Y. V. A.; JEON, Y. J.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*). **Food Chemistry**, v. 79, p. 69-77, 2002.

KHOR, E. Chitin: a biomaterial in waiting. **Current Opinion in Solid State & Materials Science**, v.00, n. 00, p.00, 2001.

KIOKIAS, S.; GORDON, M. H. Antioxidant properties of annatto carotenoids. **Food Chemistry**, v. 83, p. 523-529, 2003.

KOLEVA, I. I.; van BEEK, T. A.; LINSEN, J. P. H.; GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 8-17, 2002.

KRZYTEK, L.; SIENKIEWICZ, A.; PARDI, L.; BRUNEL, L. C. DPPH as a standard for high-field EPR. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 125, p. 207-211, 1997.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 117-120, 1998.

LANCASTER, F. E.; LAWRENCE, J. F. High-performance liquid chromatographic separation of carminic acid, α - and β -bixin, and α - and β -norbixin, and the determination of carminic acid in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 732, p. 394-398, 1996.

LATSCHA, T. **Carotenoids – their nature and significance in animal feeds**. Depto. Of animal nutrition and health – F. Hoffmann / La Roche Ltda, Basel, Switzerland, 1990.

LIM, K. T.; HU, C.; KITTS, D. D. Antioxidant activity of a *Rhus verniciflua* stokes ethanol extract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 229-237, 2001.

LORTIE, R. Enzyme catalyzed esterification. **Biotchnology Advances**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 1997.

MASCHIO, P. di.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 274, p. 532-538, 1989.

MASCHIO, P di.; MURPHY, M. E. ; SIES, H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.53S, p. 194S-200S, 1991.

MASCHIO, P di.; SUNDQUIST, A. R.; DEVASAGAYAM, T. P. A.; SIES, H. Assay of Lycopene and other Carotenoids as Singlet Oxygen Quenchers. **Methods in Enzymology**, v. 213, p. 429-438, 1992.

MANGRICH, A. S. **Cadernos de EPR**. Curitiba, Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, 2002.

MANOR, P. C. and SAENGER, W. Topography of cyclodextrin inclusion complexes III. Crystal and molecular structure of cyclohexaamylose hexahydrate, the (H₂O)₂ inclusion complex. **Journal of the American Chemical Society**, v. 96, n. 1, pp. 3630-3639, 1974.

MARANGONI, A. G.; ROUSSEAU, D. Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. **Trends in Food Sciences & Technology**, v. 6, p. 329-335, 1995.

MARTINES, M. A. U.; DAVOLOS, M. R.; JÚNIOR, M. J. O efeito do ultra-som em reações químicas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 251-256, 2000.

MARUYAMA, T.; NAKAJIMA, M.; SEKI, M. Effect of Hydrocarbon-Water interfaces on Syntetic and hydrolytic Activities of Lipases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 3, p. 242-247, 2001.

MATIOLI, G. **Seleção de microorganismos e caracterização da sua enzima ciclodextrina glicosiltransferase**. 204f. Curitiba, 1997. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MAUGARD, T.; LEGOY, M. D. Enzymatic synthesis of derivatives of vitamin A in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatics**, v. 8, p. 275-280, 2000.

MENDES, S. V. Formação de complexos de inclusão entre ciclodextrinas e bixina, o carotenóide majoritário de sementes de urucum (*Bixa orellana*, L.). 113 f. Curitiba,

2000. Dissertação (mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MERA PHARMACEUTICALS. **Astaxanthin.** Disponível em <http://www.astaxanthin.org> Acesso em sep 2002.

MERCK INDEX. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 10^o.Ed. Published by Merck & Co., Inc. – Rahway , N.J. – USA, 1983.

MILLER, N. J.; SAMPSON, J./ CANDEIAS, L. P.; BRAMLEY, P. M.; RICE-EVANS, C. A. antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. **FEBS Letters**, v. 384, p. 240-242, 1996.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J. Detection of bixin, lycopene, canthaxanthin and b-apo-8'-carotenal in products derived from red pepper. **Journal of the AOAC international**, v. 78, n. 2, p. 491-496, 1995.

MIYAKE, K. HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Solubility and mass and nuclear magnetic resonance spectroscopic studies on interaction of cyclosporine A with dimethyl – α - and β -cyclodextrins in aqueous solution. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 1, p. 39-45, 1999.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitosan-based dietary foods. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, p. 309-316, 1996.

MUZZARELLI, R. A. A. Colorimetric Determination of chitosan. **Analytical Biochemistry**, v. 260, p. 255-257, 1998.

NAKANO, L. C. G. **Urucum – Corante de origem vegetal.** 46f. Palotina, 1991. Monografia (pós-graduação – Tecnologia de Alimentos) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná – FUMESP.

NANJO, F.; GOTO, K.; SETO, R.; SUZUKI, M.; SAKAI, M.; HARA, Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 1996.

NIKI, E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? **Nutrition**, v. 19, n. 6, p. 524-525, 2002.

NOMURA, T.; KIKUCHI, M.; KUBODERA, A.; KAWAKAMI, Y. Proton-Donative Antioxidant Activity of Fucoxanthin with 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH). **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 42 , n. 2, p. 361-370, 1997.

NOVOZYMES. Product Specification. Lipozyme TL IM. Denmark, 2001.

NOVOZYMES. Product Specification. Novozym 435. Denmark, 2001.

OKAMOTO, Y.; NOSE, M.; MIYATAKE, K.; SEKINE, J.; OURA, R.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Physical changes of chitin and chitosan in canine gastrointestinal tract. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 211-215, 2001.

OKUYAMA, K.; NOGUCHI, K.; KANENARI, M.; EGAWA, T.; OSAWA, K.; OGAWA, K. Structural diversity of chitosan and its complexes. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 237-247, 2000.

OLIVEIRA, L. F. C.; DANTAS, S. O.; VELOZO, E. S.; SANTOS, P. S.; RIBEIRO, M. C. C. Resonance Raman investigation and semi-empirical calculation of the natural carotenoid bixin. **Journal of Molecular Structure**, v. 435, p. 101-107, 1997.

OLIVEIRA, A. C.; ROSA, M. F.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid – a kinetic study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 999-1005, 2001.

OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 543-555, 2000.

ONG, A. S. H.; TEE, E. S. Natural sources of carotenoids from plants and oils. **Methods in Enzymology**, v. , p. 144-167, 1992.

OTTØY, M. H.; VÅRUM, K. M.; SMIDSRØD, O. Compositional heterogeneity of heterogeneously deacetylated chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, n. 1, p. 17-24, 1996.

PÁEZ, B. C.; MEDINA, A. R.; RUBIO, F. C.; MORENO, P. G. Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 845-853, 2003.

PALACE, V. P.; KHAPER, N.; QIN, Q.; SINGAL, P. K. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 5/6, p. 746-761, 1999.

PALLOZA, P.; KRINSKY, N. I. Antioxidant Effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 213, p. 403-420, 1992.

PAUMGARTTEN, F. J. R.; De-CARVALHO, R. R.; ARAUJO, I. B.; PINTO, F. M.; BORGES, O. O.; SOUZA, C. A. M.; KURIYAMA, S. N. Evaluation of the development toxicity of annatto in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1595-1601, 2002.

PFANDER, H. P. Carotenoids: an overview. **Methods in Enzymology**, v. 213, p. 3-13, 1992.

PFANDER, H. P.; RIESEN, R. Chromatography: part IV. High performance liquid chromatography. In: **Carotenoids: Isolation and Analysis**, v. 1A, p. 145-190. Edited by G. Britton, S. Liaasen-Jensen and H. Pfander, 1995.

POLYAKOV, N. E.; LESHINA, T. A.; KONOVALOVA, T. A.; KISPERS, L. D. Carotenoids as scavengers of free radicals in a fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 3, p. 398-404, 2001.

PRESTON, H. D.; RICKARD, M. D. Extraction and chemistry of annatto. **Food Chemistry**, v. 5, p. 47-56, 1980.

PRIOR, R. L.; CAO, G. *in vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 11/11, p. 1173-1181, 1999.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant Activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIÈRES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. **Polymer**, v. 40, p. 7029-7032, 1999.

ROUSSEAU, E. J.; DAVISON, A. J.; DUNN, B. protection by β -carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 13, p. 407-433, 1992.

SALIS, A.; SVENSSON, I.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V.; ADLERCREUTZ, P. The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginosa*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 36781, p. 1-7, 2002.

SCHIEDT, K. Chromatography: Part III. Thin Layer Chromatography. In: **Carotenoids: Isolation and Analysis**, v. 1A, p. 131-144. Edited by G. Britton, S. Liaasen-Jensen and H. Pfander, 1995.

SCHIEDT, K. & LIAAEN-JENSEN, S. Carotenoids: Isolation and Analysis. In: **Carotenoids: Isolation and Analysis**, v. 1A, p. 81-108. Edited by G. Britton, S. Liaasen-Jensen and H. Pfander, 1995.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 37, p. 1608-1633, 1998.

SCOOTER, M. J.; WILSON, L. A.; APPLETON, G. P.; CASTLE, L. Analysis of Annatto (*Bixa orellana*) Food Coloring Formulations. 1. Determination of Coloring Components and Colored Thermal Degradation Products by High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 1031-1038, 1998.

SHIMOJOH, M.; FUKUSHIMA, K.; KURITA, K. Low-molecular-weight chitosans derived from β -chitin: preparation, molecular characteristics and aggregation activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 35, p. 223-231, 1998.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVA, C. R.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. de L. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. **Pharmacological Research**, v. 43, n. 6, p. 561-566, 2001.

SLATER, T. F. **Free radical mechanisms in tissue injury**. Pion Limited – London, 1972.

SOLER-RIVAS, C.; ESPÍN, J. C.; WICHES, H. J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 330-338, 2000.

STAHL, W.; SIES, H. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 396, n. 1, p. 1-9, 1996.

SUBAGIO, A.; MORITA, N. No effect of esterification with fatty acid on antioxidant activity of lutein. **Food Research International**, v. 34, p. 315-320, 2001.

SUN, W.; DUNFORD, H. B. Kinetics of Trolox C oxidation by lactoperoxidase compound II. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 194, n. 1, p. 306-311, 1993.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. Production, properties and some new applications of chitin and its derivatives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 2, p. 143-171, 2003.

SZEJTLI, J. **Cyclodextrin Technology** – Kluwer Academic Publishers, 1988.

THARANATHAN, R. N.; KITTUR, F. S. Chitin – The Undisputed Biomolecule of Great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 61-87, 2003.

TAUNGBODHITHAM, A. K.; JONES, G. P.; WAHLQVIST, M. L.; BRIGGS, D. R. Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 577-584, 1998.

TENG, W. L.; KHOR, E.; TAN, T. K.; LIM, L. Y.; TAN, S. C. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. **Carbohydrate Research**, v. 332, p. 305-316, 2001.

TENJARLA, S.; PURANAJOTI, P.; KASINA, R.; MANDAL, T. Preparation, Characterization and Evaluation of Miconazole-Cyclodextrin Complexes for Improved Oral and Topical Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 4, p. 425-429, 1998.

TJP MARKET DEVELOPMENT. **Annatto**. Disponível em <http://www.tjpd.com/annatto.html> Acesso em oct1998.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 310-313, 2001.

TOTANI, N.; MURAMATSU, T. A new procedure for the acetylation of lipids. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 29, p. 375-377, 1981.

TYRAKOWSKA, B.; SOFFERS, A. E. M.; SZYMUSIAK, H. BOEREN, S.; BOERSMA, M. G.; LEMANSKA, K.; VERVOORT, J.; RIETJENS, I. M. C. M. TEAC antioxidant activity of 4-hydroxybenzoates. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 11/12, p. 1427-1436, 1999.

UCSD, 2004. Disponível em <http://www-bioeng.ucds.edu/~herrgard/activation.html> Acesso em março, 2004.

UEDA, J. L.; SAITO, N.; SHIMAZU, Y.; OSAWA, T. A Comparison of Scavenging Abilities of Antioxidants against Hydroxyl Radicals. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 333, n. 2, p. 377-384, 1996.

UPPENGERG, J.; PATKAR, S.; BERGFORS, T.; JONES, T. A. Crystallization and preliminary X-ray Studies of Lipase B from *Candida antarctica*. **Journal of Molecular Biology**, v. 235, p. 790-792, 1994.

VACHOUD, L.; ZYDOWICZ, N.; DOMARD, A. Sorption and desorption studies on chitin gels. **International Journal of Biological Macromolecules – Structure, Functions and Interactions**, v. 28, p. 93-101, 2001.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113-148, 2000.

XIE, W.; XU, P.; LIU, Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 1699-1701, 2001.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Total Antioxidant Capacity of Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 03, p. 701-705, 1996.

WEEDON, B. C.; MOSS, G. P. Structure and Nomenclature. In: **Carotenoids: Isolation and Analysis**, v. 1A, p. 81-108. Edited by G. Britton, S. Liaasen-Jensen and H. Pfander, 1995.

WETTASINGUE, M.; SHAHIDI, F. Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. **Food Chemistry**, v. 70, p. 17-26, 2000.

WOODALL, A. A.; BRITTON, G.; JACKSON, M.J. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxyl radicals: Relationship between carotenoid structure and protective ability. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1336, p. 575-586, 1997.

WURTZ, M. L.; TORREBLANCA, R. A. Analises de la semilla *Bixa orellana*, L. (achiote) y del descho generado em la extraccion de sus pigmentos. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 33, n. 3, p. 606-619, 1983.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 438-450, 1998.

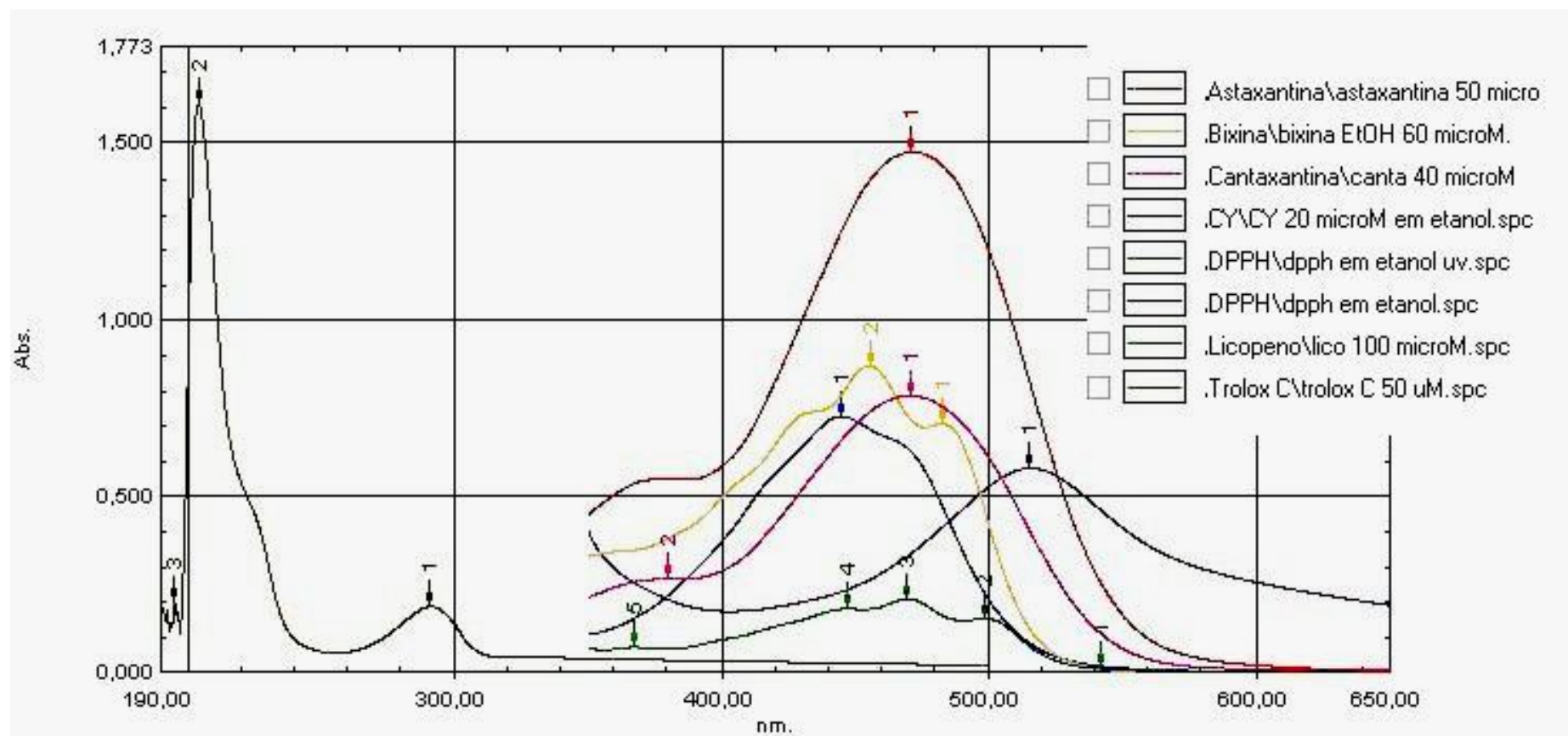
YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAOKA, J. HPLC methods for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 6, p. 1201-1204, 1998.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 20-27, 2001.

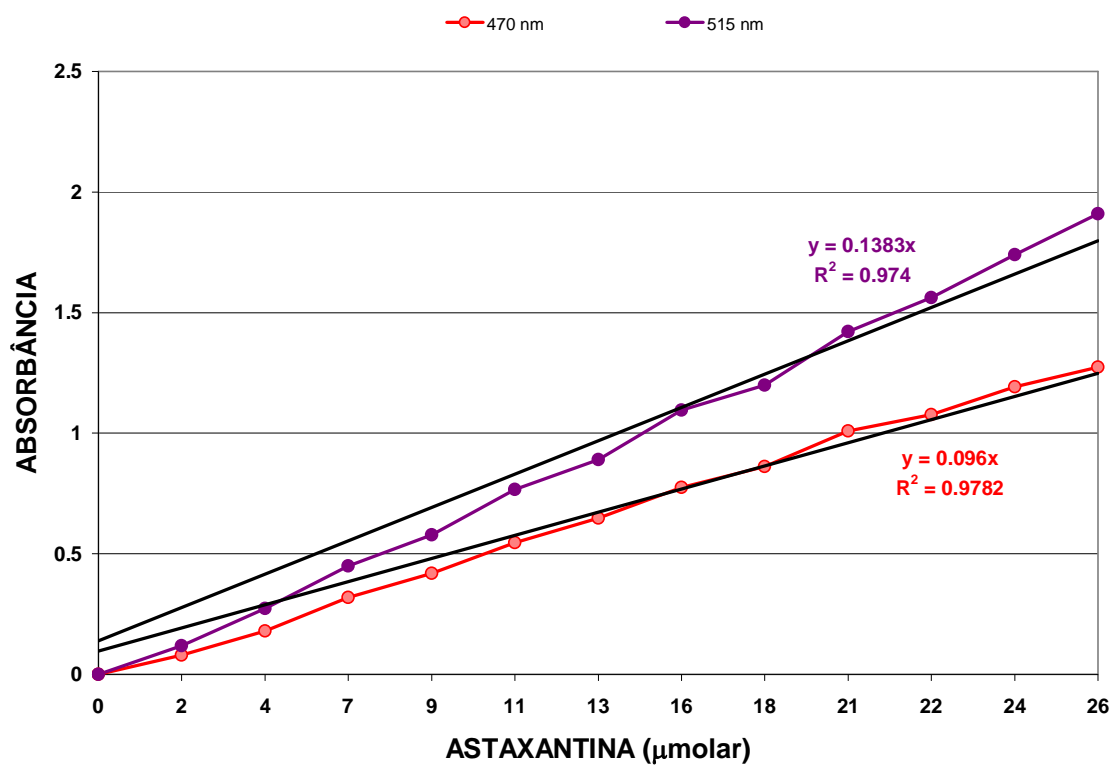
YUAN, J. P.; CHEN, F. Kinetics for the reversible isomerization reaction of *trans*-astaxanthin. **Food Chemistry**, v. 73, p.131-137, 2001.

YOSHII, H.; KOMETANI, T.; FURUTA, T. WATANABE, Y. LINKO, Y.; LINKO, P. Formation of inclusion complexes of cyclodextrin with ethanol under anhydrous condition. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 11, p. 2166-2170, 1998.

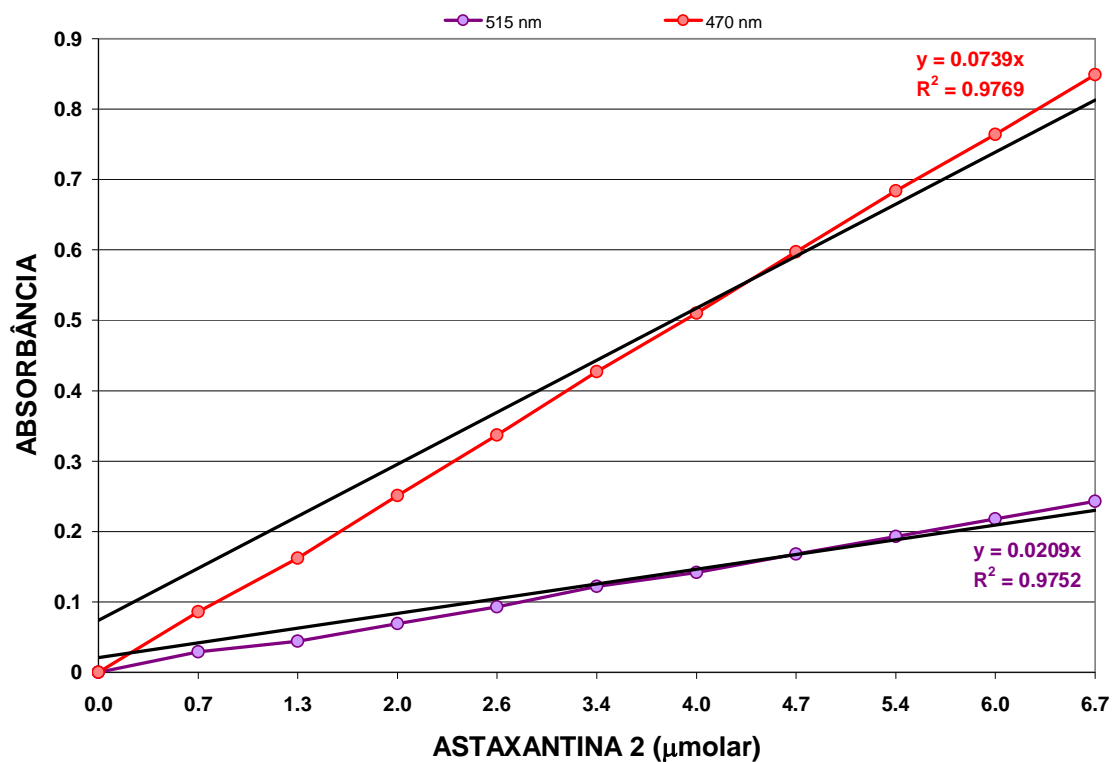
ZANG, L. Y.; SOMMERBURG, O.; KUIJK, F. J. G. M van. Absorbance changes of carotenoids in different solvents. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23, n. 7, p. 1086-1089, 1997.



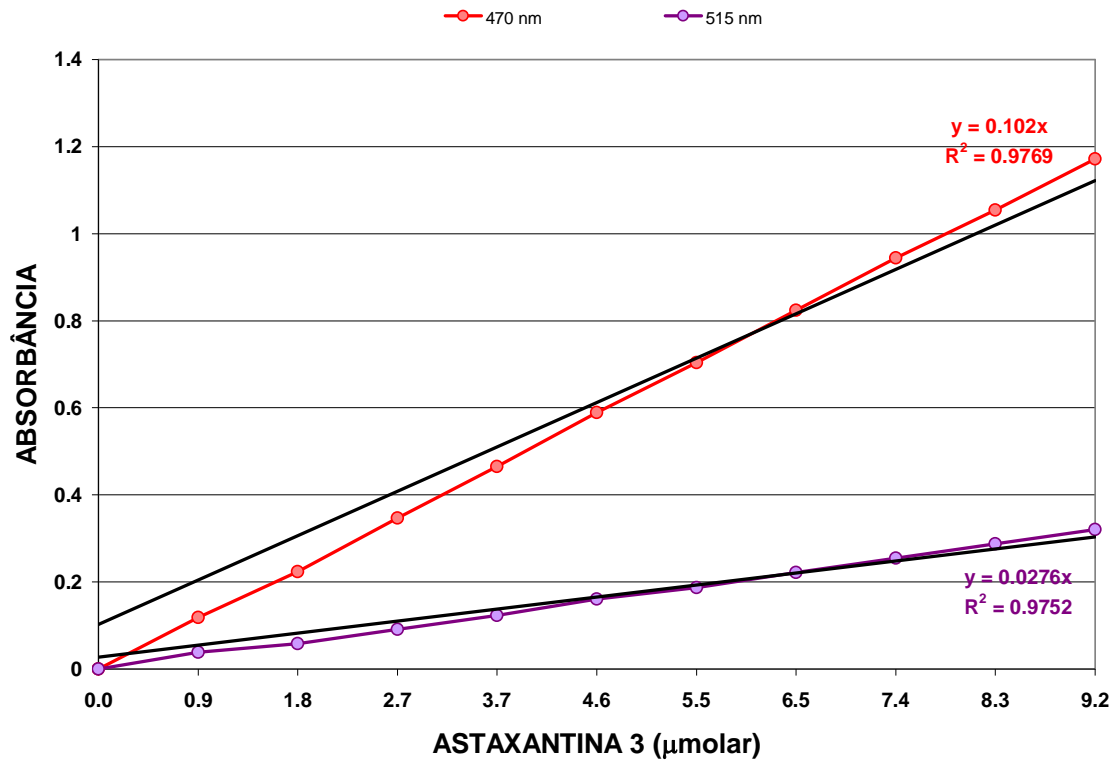
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A ASTAXANTINA



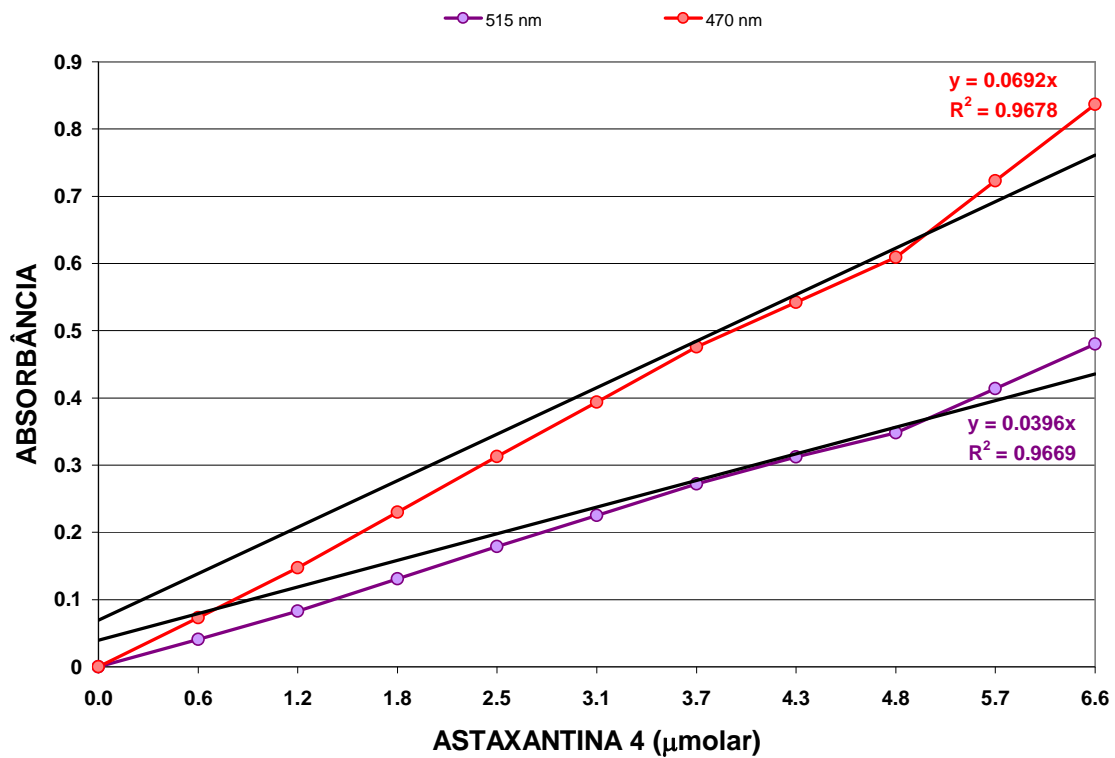
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A ASTAXANTINA 2



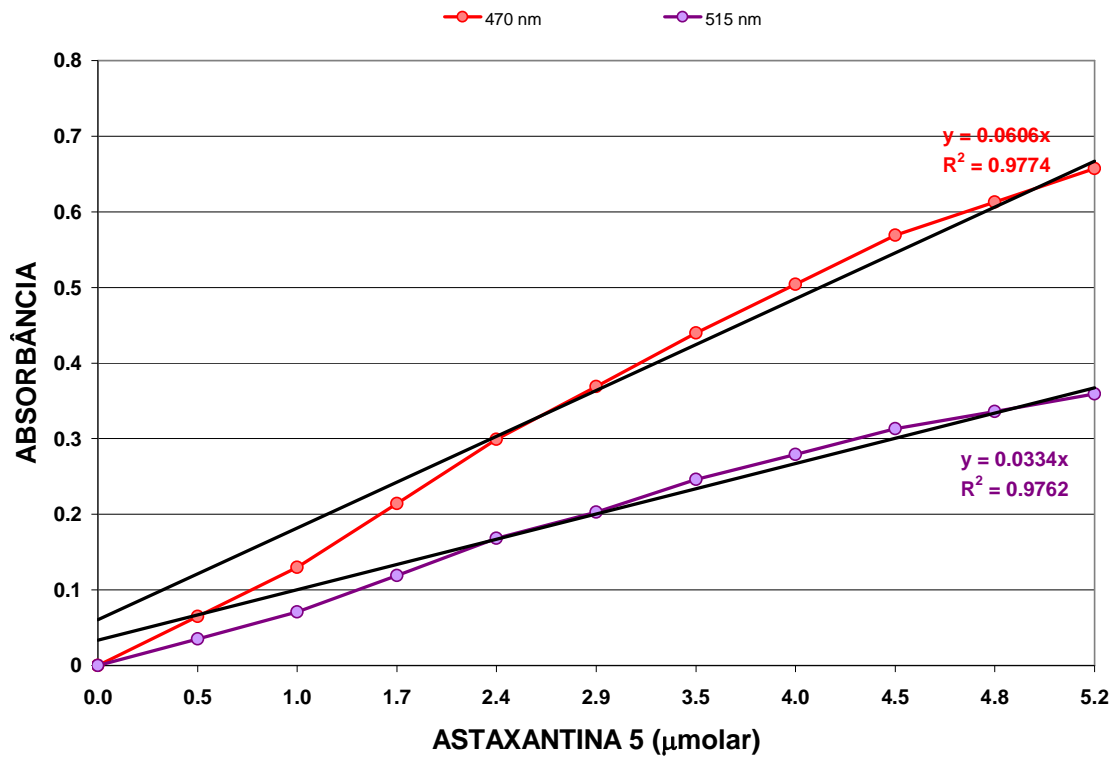
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A ASTAXANTINA 3



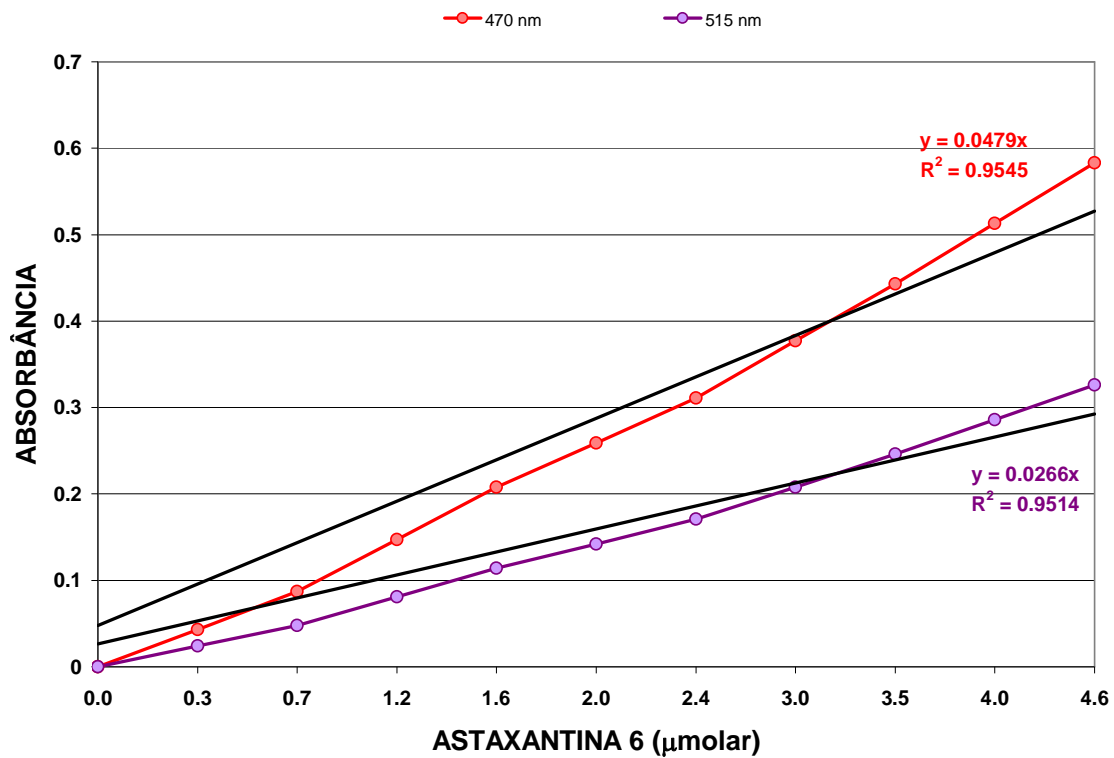
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A ASTAXANTINA 4



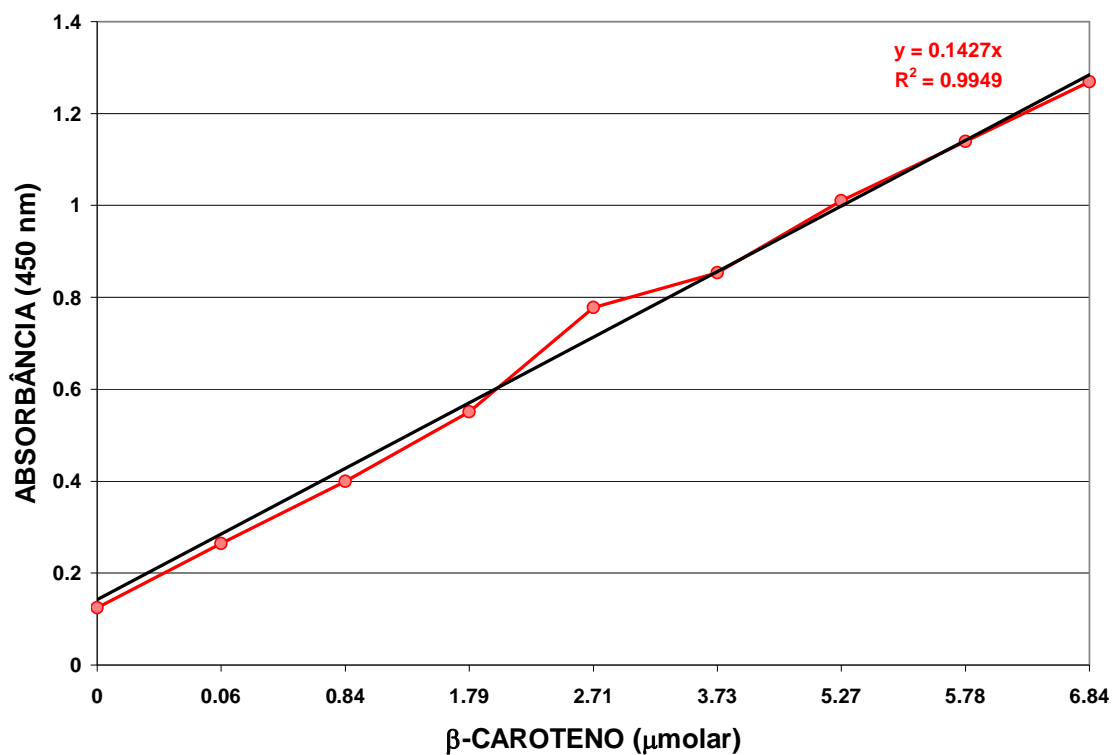
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A ASTAXANTINA 5



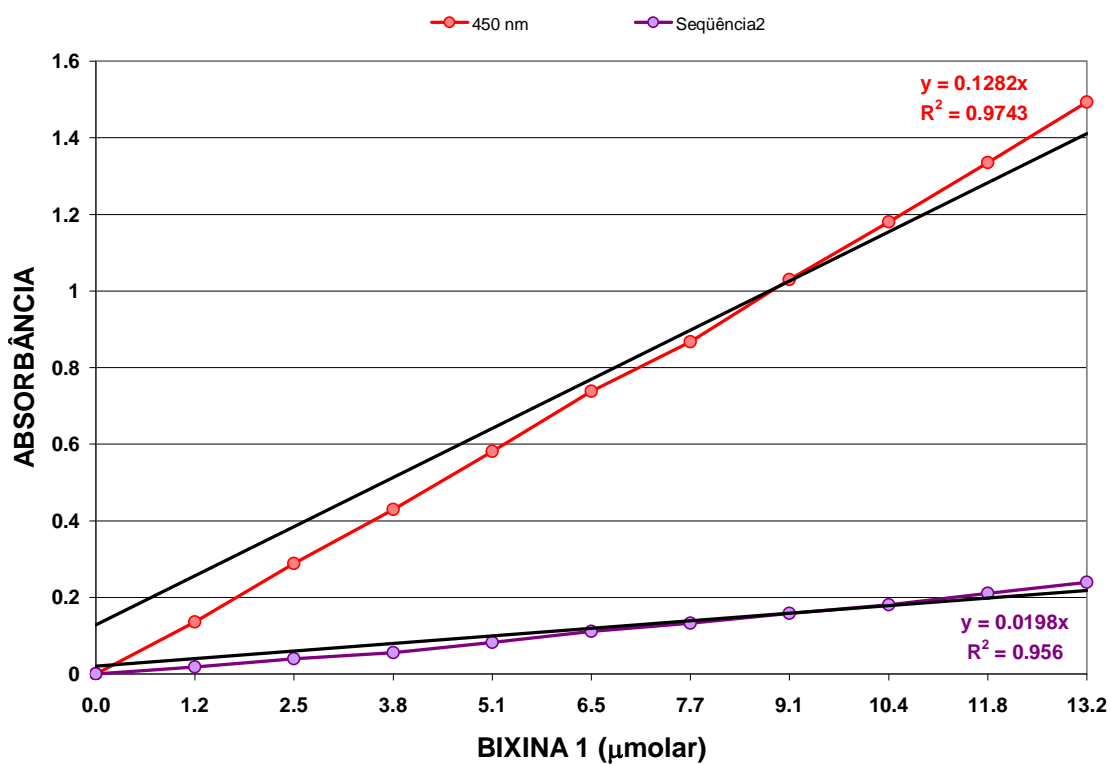
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A ASTAXANTINA 6



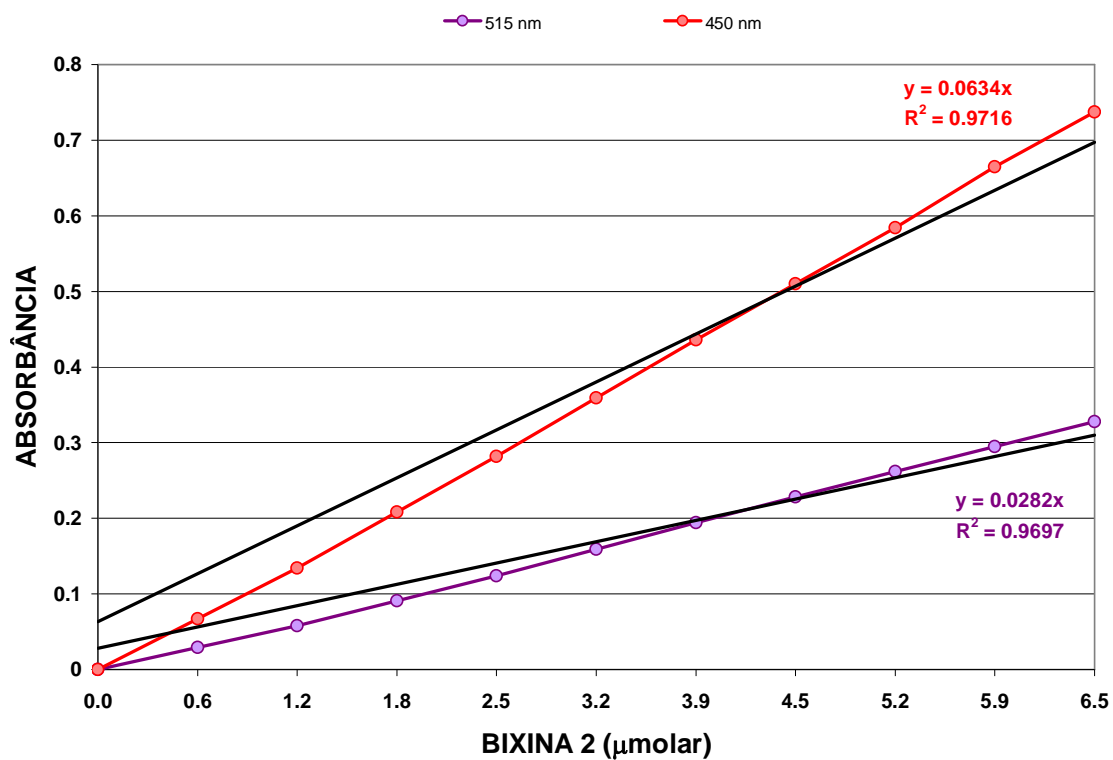
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O β -CAROTENO



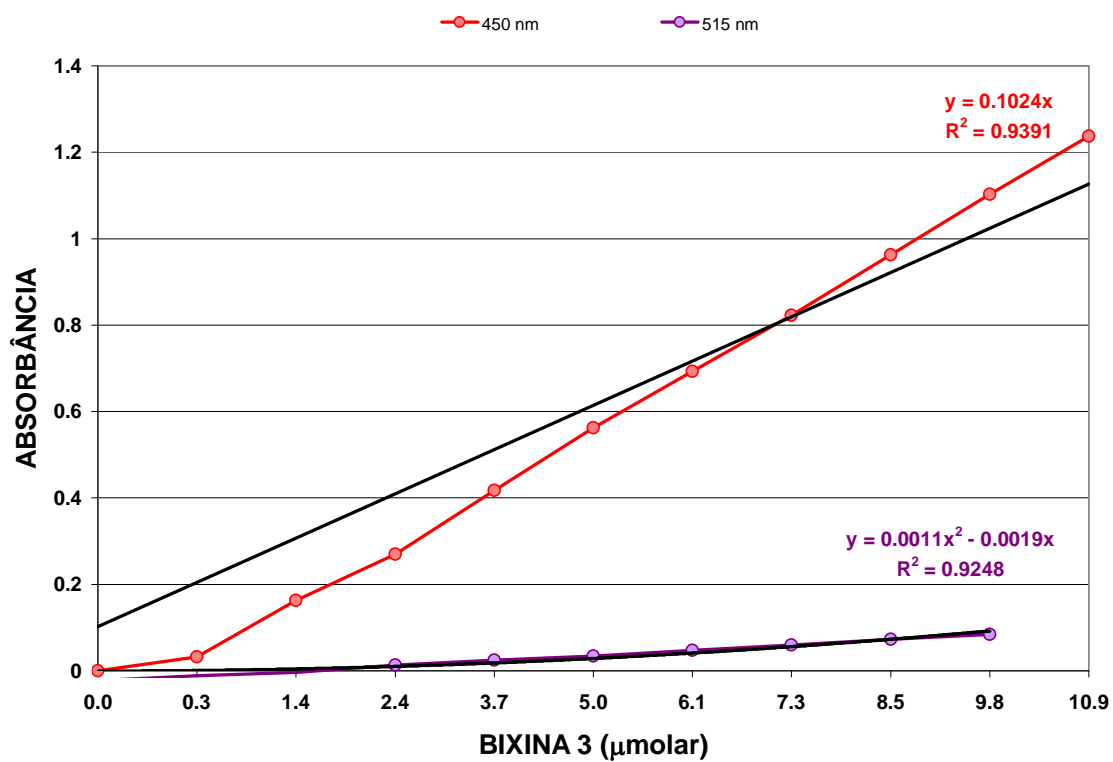
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A BIXINA 1



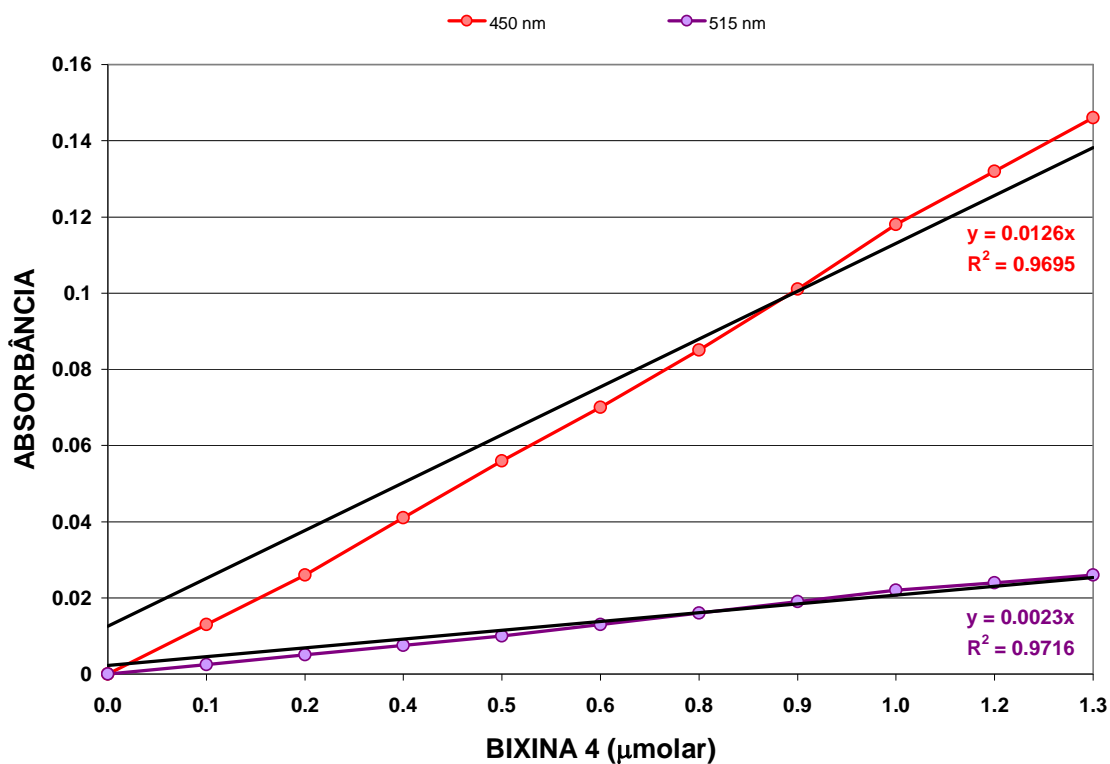
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A BIXINA 2



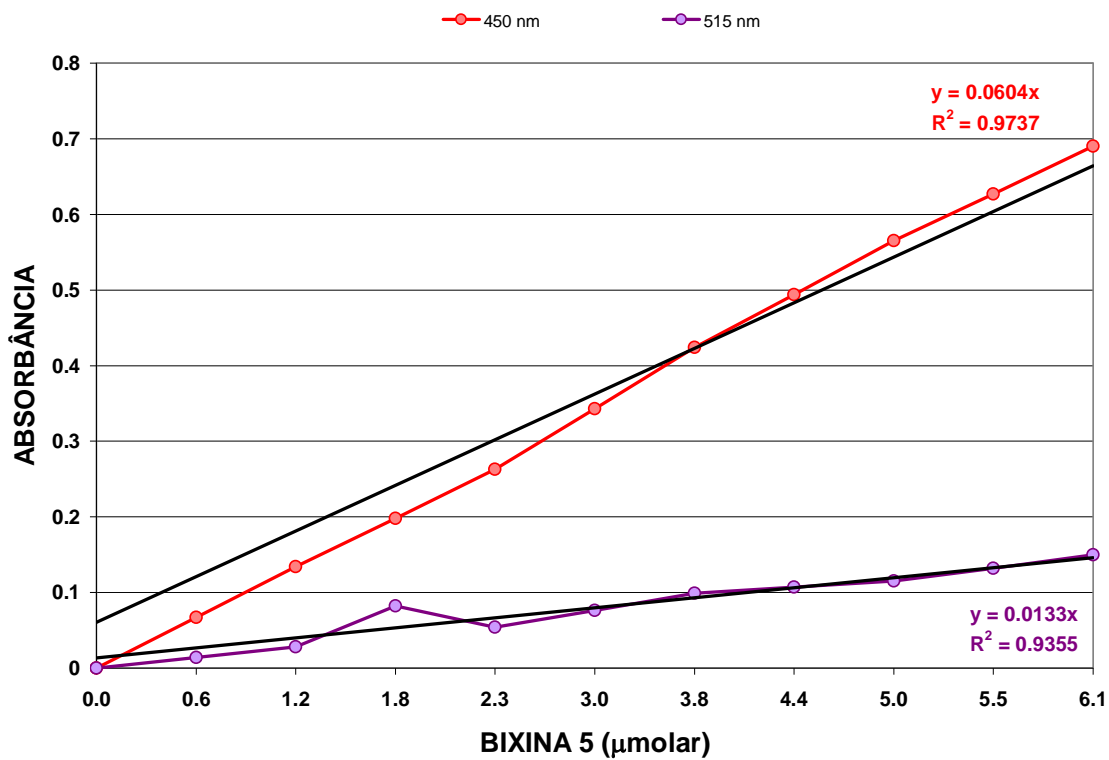
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A BIXINA 3



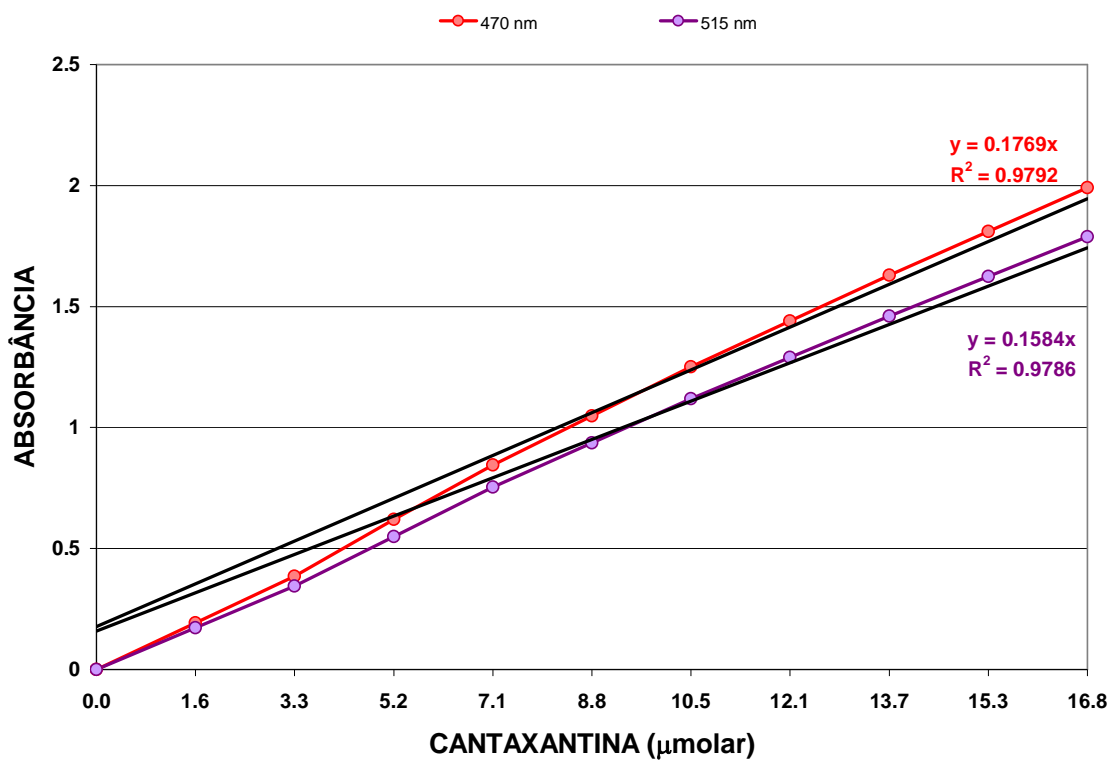
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A BIXINA 4



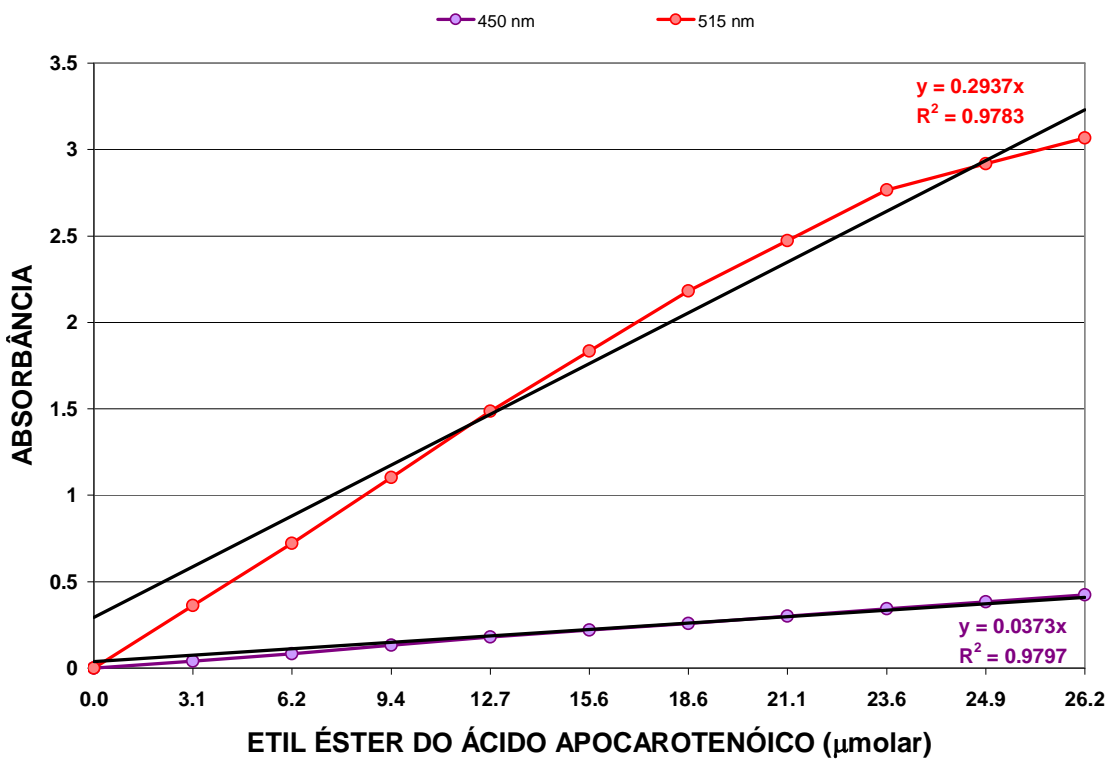
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A BIXINA 5



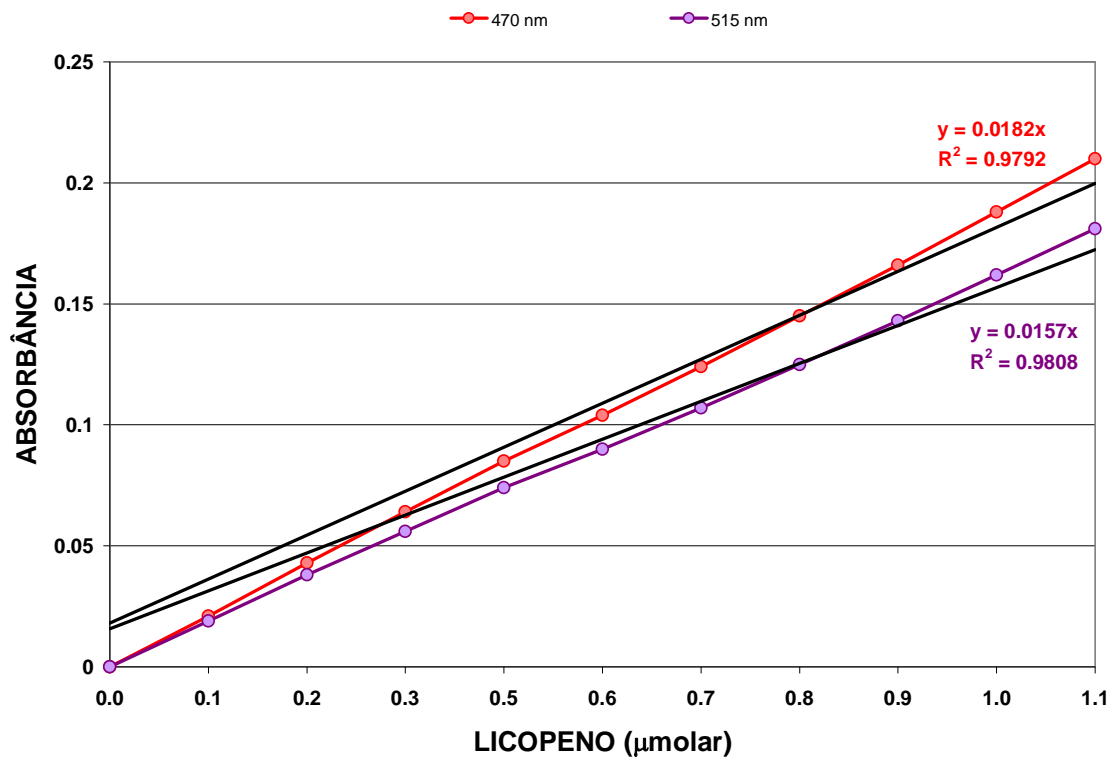
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A CANTAXANTINA



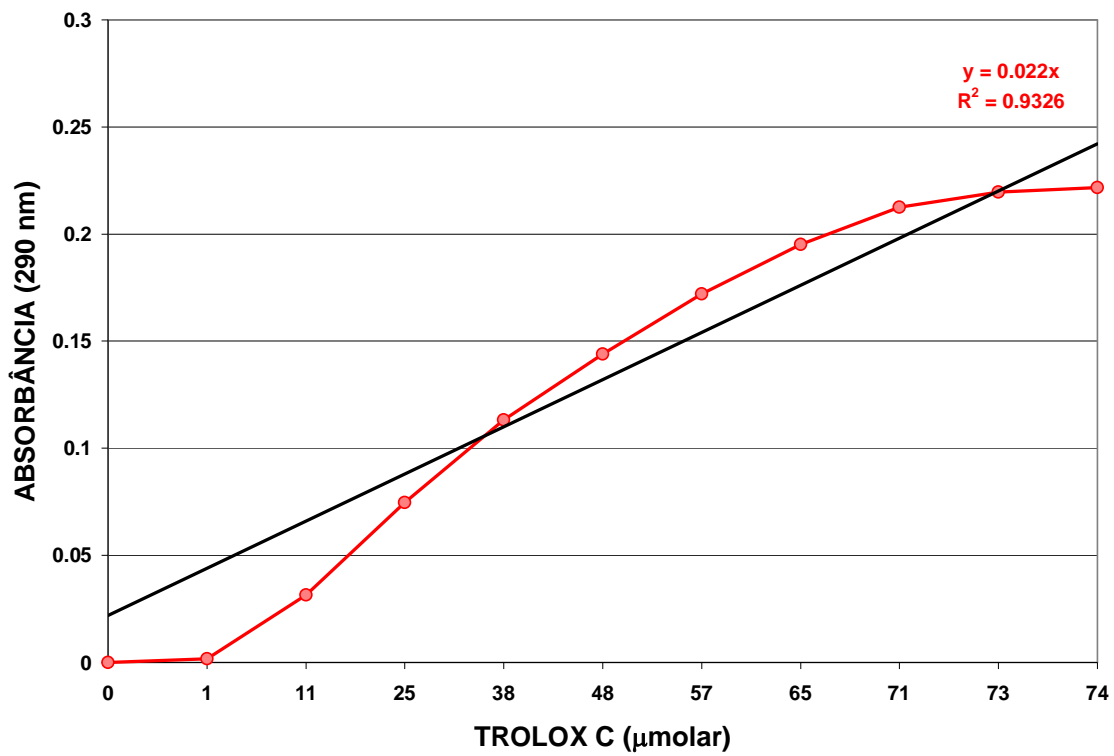
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O ETIL ÉSTER DO ÁCIDO APOCAROTENÓICO



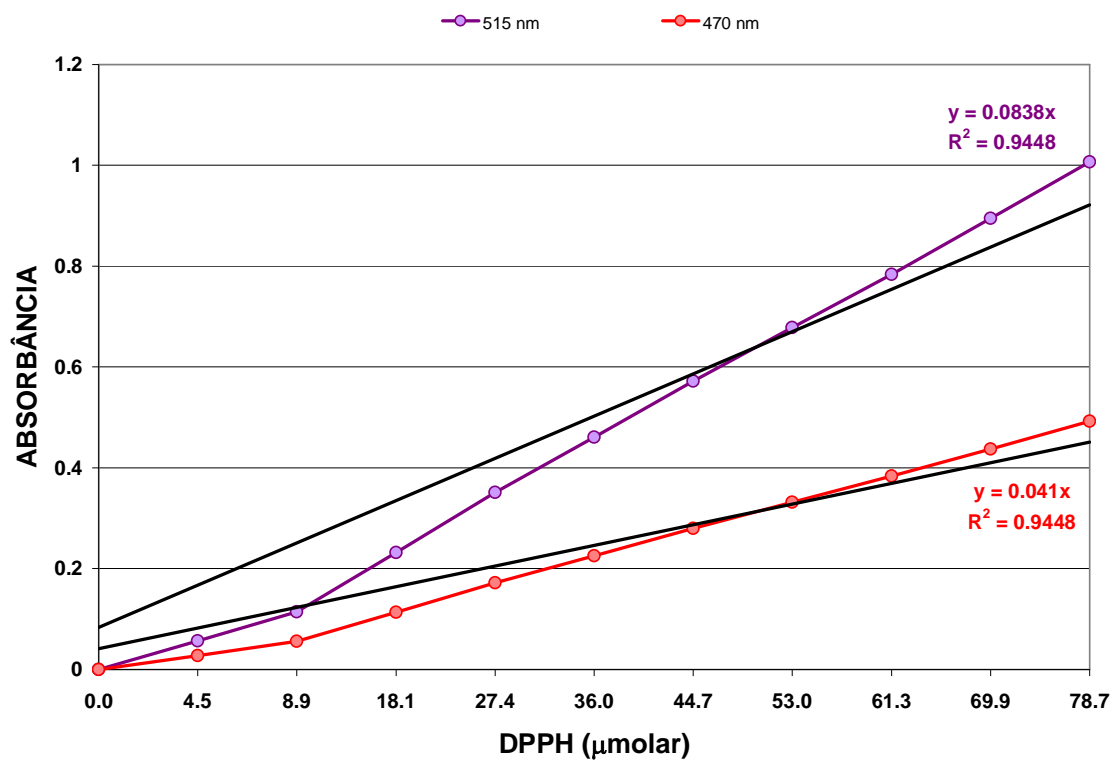
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O LICOPENO



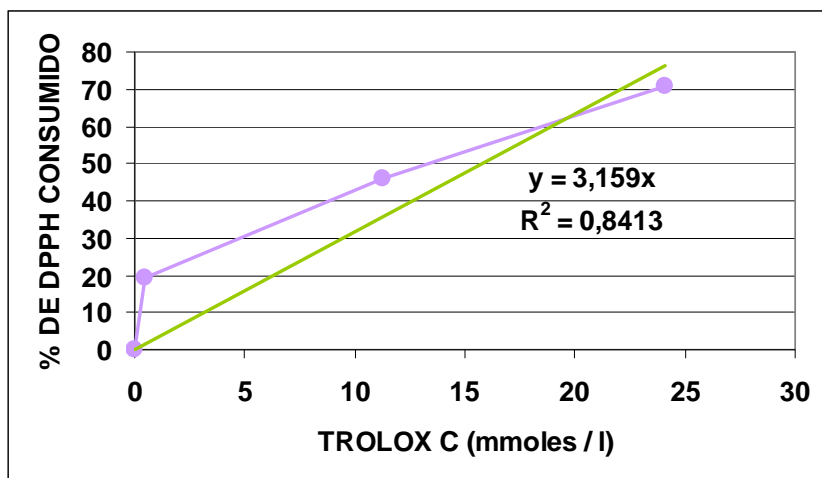
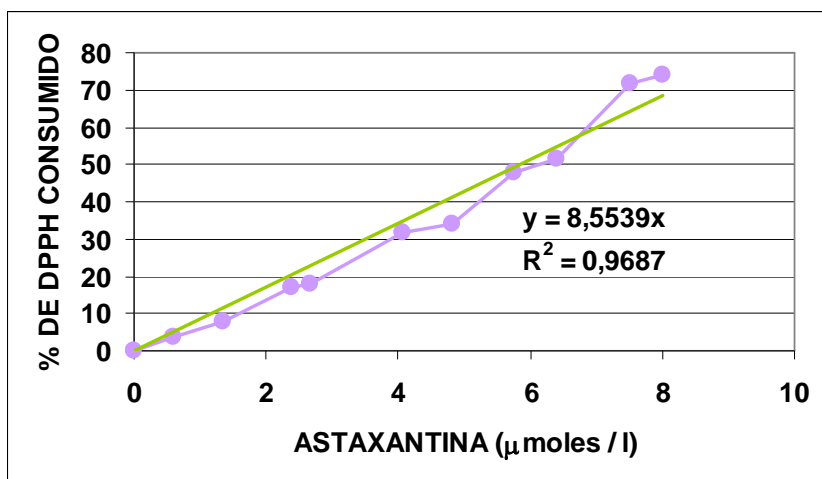
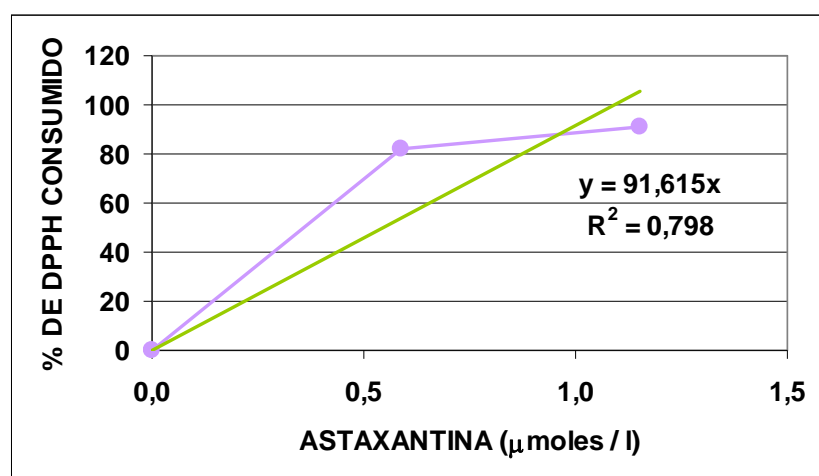
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O TROLOX C



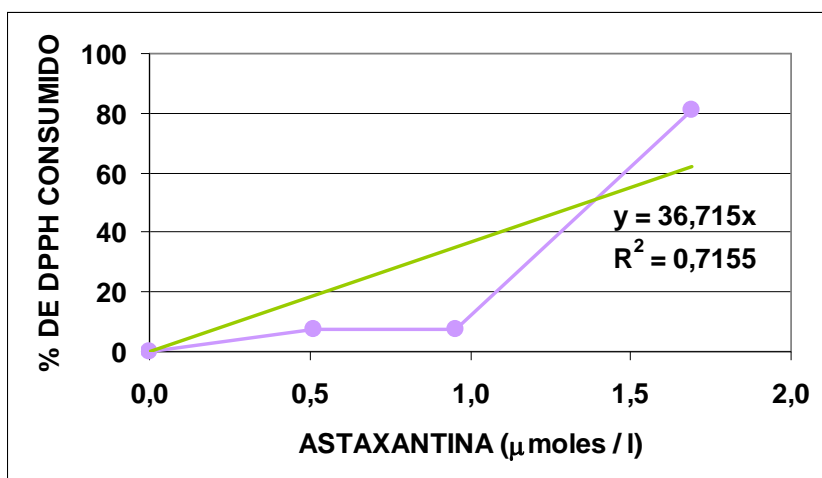
CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O RADICAL LIVRE DPPH



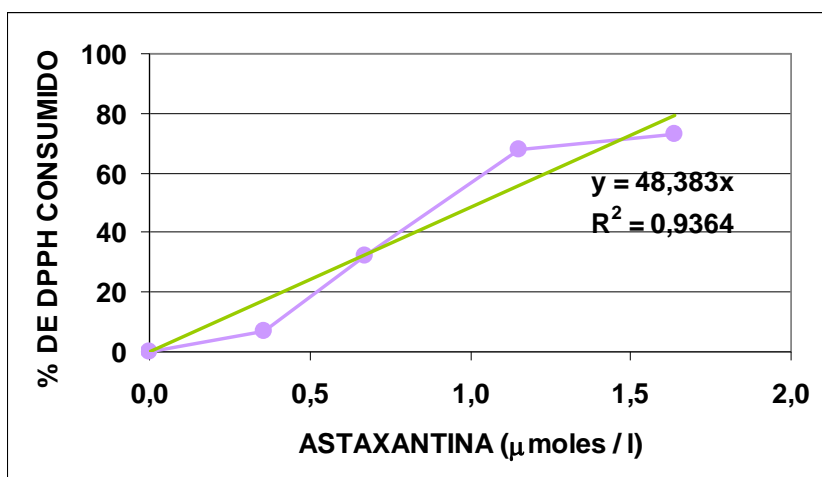
**ANEXO III – GRÁFICOS DE PORCENTAGEM DE REDUÇÃO DO RADICAL DPPH
versus CONCENTRAÇÃO DO CAROTENÓIDE**

TROLOX C**ASTAXANTINA****ASTAXANTINA TRATADA COM LIPASE NOVOZYME 435**

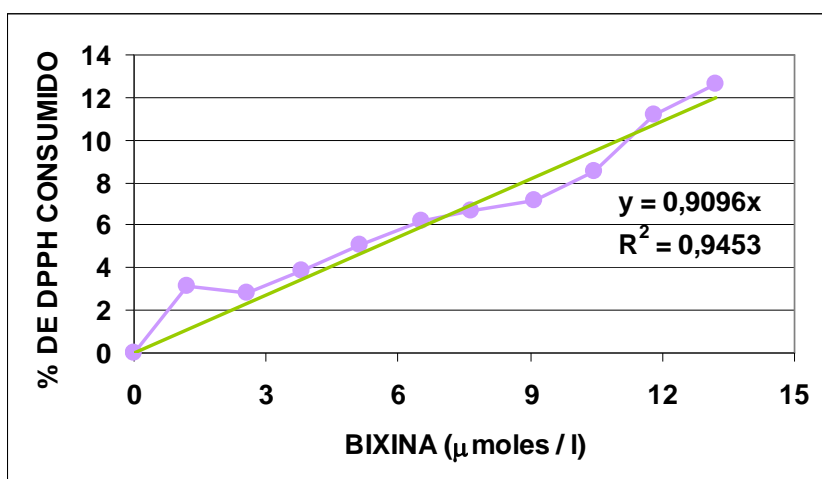
ASTAXANTINA TRATADA COM LIPASE LIPOZYME TL IM



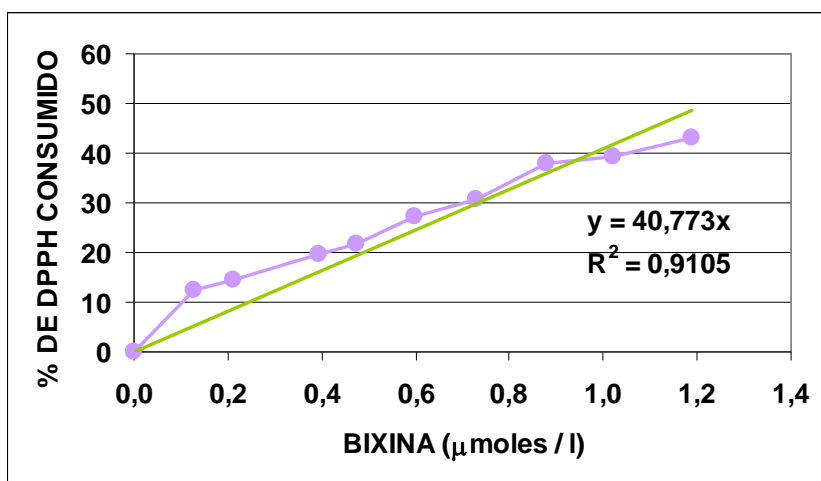
ASTAXANTINA TRATADA COM LIPASE BOVINA



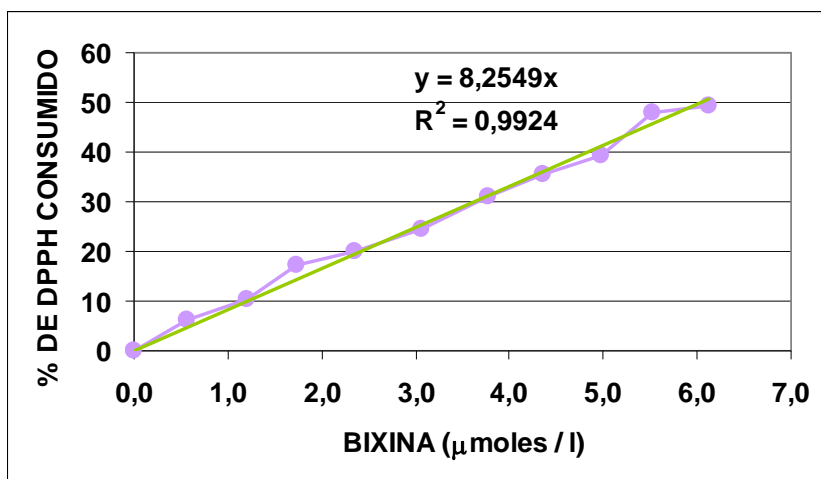
BIXINA



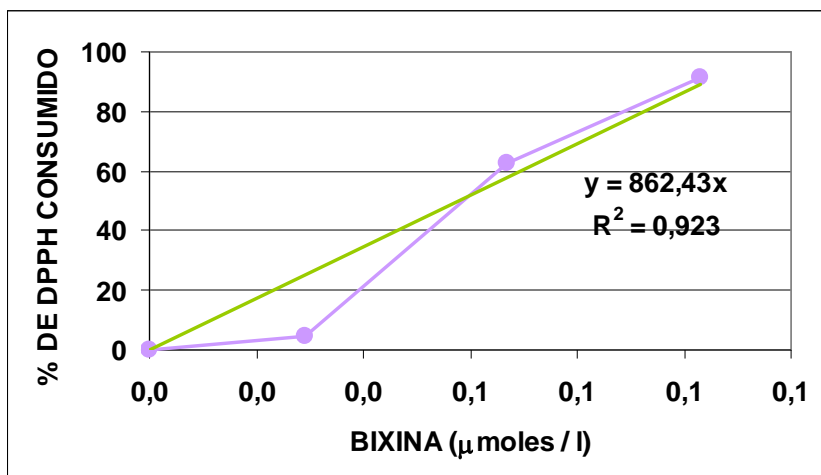
BIXINA TRATADA COM LIPASE NOVOZYME 435

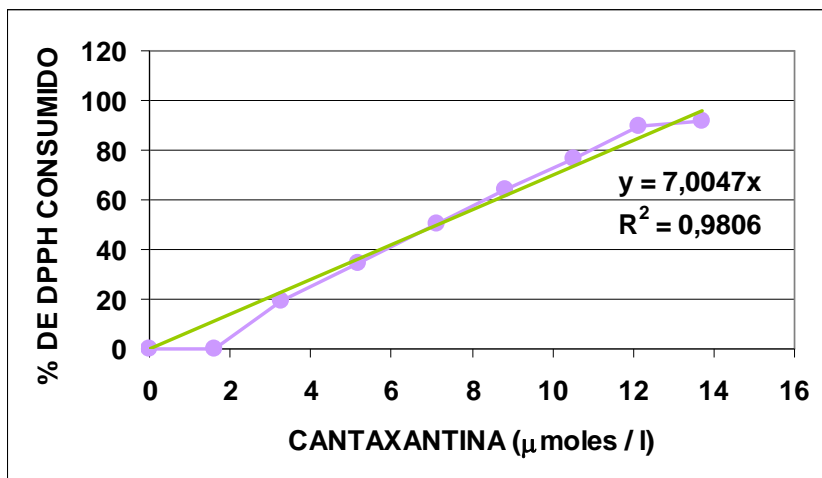
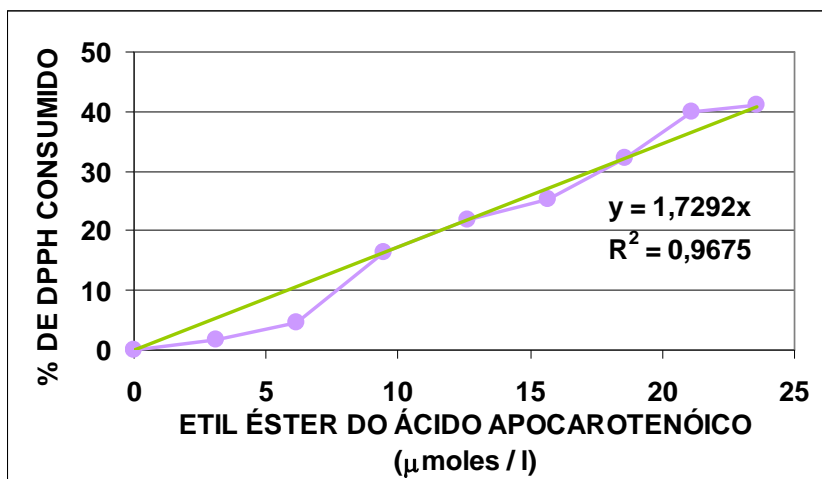


BIXINA TRATADA COM LIPASE LIPOZYME TL IM



BIXINA TRATADA COM LIPASE BOVINA



CANTAXANTINA**ETIL ÉSTER DO ÁCIDO APOCAROTENÓICO****LICOPENO**